

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Klaus Hölldack

Die Einwirkung von Azathioprin
auf menschliches Knochenmark in vitro.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der ehem. Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Barbara Willigerodt geb. Altmann
aus Berlin

1970

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Klaus Holldack

Die Einwirkung von Azathioprin
auf menschliches Knochenmark in vitro.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der ehem. Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Barbara Willigerodt geb. Altmann
aus Berlin

ehem.Dekan: Professor Dr.med. Herbert Lax

Referent: Professor Dr.med. Irene Boll

Korreferent: Professor Dr.med. Horst Brücher



Promoviert am: 13.10.1970

INHALT

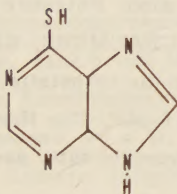
	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	4
II. Methode	11
III. Ergebnisse	18
IV. Diskussion	29
V. Zusammenfassung	36
VI. Tabellen und Abbildungen	37
VII. Literatur	56



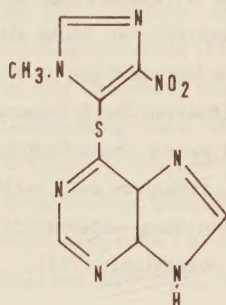
Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung und Problemstellung.

Aus der Gruppe der Thiopurine entwickelten 1959 HITCHINGS, ELION und Mitarbeiter ein 6-Mercaptopurinderivat, das in die Literatur mit dem chemischen Trivialnamen "Azathioprin" einging. Es handelt sich um ein 6-(-1-Methyl-4-nitro-5-imidazolyl-thio-)-purin, das den Handelsnamen Imuran[®] trägt, früher auch Imurel[®] und Imurek[®] genannt. Eine Veröffentlichung des genauen Synthesewegs des Azathioprin erschien 1965 von KOCHERGIN und Mitarbeitern (30).



6-Mercaptopurin



Azathioprin

Azathioprin kann oral und intraperitoneal appliziert werden, wobei die orale Verabfolgung einen höheren chemotherapeutischen Index ergibt (11, 16, 36). In Stoffwechseluntersuchungen wird eine gute Resorption des Azathioprin und seine Spaltung zu 6-Mercaptopurin (6-MP) in der Leber nachgewiesen (26, 35). Nach HITZIG (26) erklärt sich die Wirkung des Azathioprin durch Spaltung des Komplexes auf Zellniveau, wodurch lokal im Gewebe 6-Mercaptopurin freigesetzt werde. Der Stoffwechsel des Azathioprin ist dem des 6-Mercaptopurin sehr ähnlich (36), nach Applikation findet man in beiden Verbindungen hohe Konzentrationen in der Milz, geringere im Darm, Leber und

Tumor. Abbau- und Ausscheidungsprodukt beider Stoffe ist hauptsächlich die inaktive 6-Thioharnsäure (16).

Als Antimetabolit gehört das Azathioprin zu der Gruppe der Cytostatica. Anstelle des normalen Metaboliten wird es von der Zelle in den Purinstoffwechsel aufgenommen und kann so zu schweren Schädigungen im Zellstoffwechsel führen (4, 13, 24, 26).

CHALMERS, KNIGHT und ATKINSON (11) zeigen, daß das Azathioprin in vivo durch eine Sekundärreaktion mit Glutathion zu 6-MP umgewandelt wird, was auf eine Untersuchung von BRESNIK (10) zurückgeht, der die Aufspaltung von Azathioprin in 6-MP in vitro durch Sulfhydrylverbindungen, wie z.B. durch das Glutathion beschreibt.

Die biologische Wirkungsweise des Azathioprin ist mit der des 6-MP nicht völlig identisch, da nicht alle Eigenschaften des Azathioprin allein durch die Umwandlung in 6-MP erklärbar sind. Folgende Beispiele mögen dies erläutern: Nach Untersuchungen von CHALMERS, KNIGHT und ATKINSON heben orale Gaben von Glutathion die cytostatische Wirkung des Azathioprin auf, nicht aber die von 6-MP. Zur Hemmung der Antikörperbildung unterstützt 5-Bromodeoxyuridin aktiv das 6-MP, nicht aber das Azathioprin (11).

Auf Grund der Therapieerfolge des 6-MP (Purinethol [®]), das sich in der Behandlung aller Formen akuter wie auch in Fällen chronisch myeloischer Leukämien bewährt hat, prüfte man die Therapiemöglichkeiten des chemisch verwandten Azathioprin bei den verschiedenen Leukämieerkrankungen (15, 36, 40, 41). Erste klinische Behandlungsergebnisse veröffentlichten ELION und RUNDLES 1961 (15, 36). In der Arbeit von ELION findet man den folgenden kurzen Hinweis, daß in der Behandlung zweier Fälle mit chronischer Granulocytenleukämie die Wirkung des Azathioprin vergleichbar ist mit der des 6-MP (15). RUNDLES nimmt einen höheren therapeutischen Effekt des Azathioprin im Vergleich mit anderen Thiopurinen an und konnte eine bessere Verträglichkeit als bei anderen Derivaten beobachten. Bei 6 von 14 Patienten mit akuter Leukämie erzielte RUNDLES eine eindeutige

Besserung unter der Behandlung mit Azathioprin (36).

1965 erschienen in einer Arbeit von ERIDIANI, TAGLIORETTI und TISO weitere Ergebnisse über klinische Versuche einer Azathioprintherapie bei verschiedenen Formen der Leukämie. Wie bei ELION (16) und RUNDLES (36) konnten auch hier keine einheitlichen Resultate erreicht werden, doch in einigen Fällen akuter Leukämien beobachtete man anhaltende Remissionen (17).

Intensiver widmete man sich jedoch den Therapiemöglichkeiten, die sich aus der immunsuppressiven Eigenschaft des Azathioprin ergaben (15, 25, 26, 32, 35). Da allen Cytostatica, zunächst als unerwünschte Nebenwirkung gewertet, gemeinsam eine Herabsetzung der Infektabwehr ist, entwickelte man in Tierversuchen Medikamente, deren Effekt weniger cytostatisch als vielmehr immunsuppressiv ist (26, 35). Zweck der immunsuppressiven Therapie ist die Hemmung der Antikörperbildung. Eine breite therapeutische Anwendung findet das Azathioprin bei den Autoimmunkrankheiten, sowie Krankheiten immunologischer Pathogenese, so z.B. bei folgenden Krankheiten: autoimmune hämolytische Anämie, idiopathische thrombozytopenische Purpura, Lupus erythematodes generalisatus, nephrotisches Syndrom, aktive chronische und "lupoide" Hepatitis, Goodpasture-Syndrom, Periarteriitis nodosa, Colitis ulcerosa, primär-chronische Polyarthrit (3, 12, 22, 23, 26, 29, 33, 34, 35, 38, 39, 43). Übereinstimmend meinen viele Autoren, daß bei corticosteroidresistenten Patienten die therapeutische Anwendung von Azathioprin besonders indiziert ist, ebenso in Fällen, bei denen man durch das Auftreten starker Nebenwirkungen während einer Langzeittherapie zur Unterbrechung der Corticosteroidbehandlung gezwungen war. In solchen Fällen konnte unter einer Azathioprinbehandlung ein Abklingen der toxischen Nebenwirkungen durch Senkung der Corticosteroiddosis erzielt werden (26, 33, 34, 35, 39).

Nach GERHARTZ ist die Wirkung des Azathioprin vorwiegend auf eine Unterdrückung der zellulären Entzündungsvorgänge sowie auf eine Proliferationshemmung des für die Antikörperbildung kompetenten

plasmazellulären Systems gerichtet (22, 23). Nach Meinung anderer Autoren wirkt die immunsuppressive Therapie weder analgetisch, noch antipyretisch, noch direkt antiphlogistisch. Offenbar hemmt das Azathioprin nicht die Entzündung als solche, sondern die Voraussetzungen für ihr Zustandekommen (3, 39). Allgemein gilt, daß sich nur eine Langzeitbehandlung mit Azathioprin als wirksam erweist, wobei erst nach einer Behandlungsdauer von wenigstens drei Wochen eine klinische Besserung einsetzt.

Erfolgreich zeigt sich auch die Anwendung des Azathioprin zur Unterdrückung der Antikörperbildung bei Organtransplantationen, insbesondere bei Nierentransplantationen (1, 26, 32). Hierbei scheint von Bedeutung zu sein, zu welchem Zeitpunkt der Transplantation das Immunsuppressivum appliziert wird. Während HITZIG (26) behauptet, daß sich bei Nierentransplantationen auch dann noch eine günstige Wirkung zeigt, wenn das Mittel nach Durchführung der Transplantation gegeben wird, trifft nach MATHÉ dies bei Knochenmarktransplantationen nicht zu. Nach MATHÉ ist das Azathioprin lediglich wirksam, wenn es während der Transplantation appliziert wird (32).

Prinzipiell muß bei der Unterdrückung der Antikörpersynthese unterschieden werden, ob ein Antigen erst neu in den Körper eingeführt wird, wie bei den Transplantationen, oder ob es bereits vorhanden ist, wie bei den Autoaggressionskrankheiten.

Der Indikation entsprechend wird das Azathioprin unterschiedlich dosiert. In der immunsuppressiven Therapie werden im Mittel 100-300 mg/die appliziert, wesentlich höhere Dosen - bis zu 450 mg/die - gibt man bei Transplantationen. RUNDLES und HITZIG beobachten bei zeitlich unbegrenzter Applikation von 100-150 mg/die in keinem untersuchten Fall auftretende Zeichen von Toxizität. In einigen Versuchen konnten 3-5 mg/kg/die gegeben werden, bevor Toxizität auftrat, die sich dann in Anorexie, Erbrechen und als hemmende Wirkung auf die Leukopoese auswirkte (26, 36). GERHARTZ beschreibt bei Dosen von 200-250 mg pro die eine nach 3-6 Wochen auftretende Leukopenie

unter $4000/\text{mm}^3$, wobei das Azathioprin Lymphocyten stärker als die Granulocyten minderte. Zugleich sanken die Erythrocytenwerte von 4,3 auf 3,8 Mill. und die Thrombocytenzahl von 150000 auf $110000/\text{mm}^3$ Blut leicht ab (23).

Zu Beginn hielt man bei der Behandlung leukämischer Erkrankungen 150-200 mg/die Azathioprin für eine ausreichende Dosierung. Allgemein hatte sich jedoch herausgestellt, daß diese Konzentrationen zu keinem überzeugenden Ergebnis führten, so daß man heute höhere Konzentrationen anwendet.

Neuere Untersuchungen von ERIDIANI ergaben Erfolge bei 1-4 mg/kg/die bis zu 350 mg/die über längere Zeit appliziert (17). TAGLIORETTI erzielte unter einer Azathioprindosis bis zu 300 mg/die in 57% der Fälle mit akuter Leukämie eine klinische und/oder hämatologische Besserung. Bei Beobachtung von Remissionen reduzierte er die Dosis auf 50-100 mg/die (42). Nach STORTI dagegen erhält man lediglich zufriedenstellende Ergebnisse in der Behandlung akuter und chronischer Formen der Leukämie, wenn man Dosen bis zu 7-8 mg/kg/die anwendet. STORTI betont, daß die Höhe der Dosierung von besonderer Bedeutung für die therapeutische Wirkung des Azathioprin ist. Mit einer Dosis von 2-3 mg/kg/die beobachtete STORTI nur eine ungenügende Zahl an Remissionen. Doch mit der höheren Dosis von 7-8 mg/kg/die wurde der durchschnittliche Prozentsatz an Remissionen erheblich gesteigert. Bei dieser hohen Dosierung kam es bei kindlichen akuten Leukämien nicht zu irreversiblen toxischen Erscheinungen. Da aber höhere Konzentrationen bei langdauernder Medikation steigende Toxizität erwarten lassen, empfiehlt STORTI eine cytostatische Stoßtherapie. Die Kurzzeitbehandlung über 6-10 Tage, im Gegensatz zur bisher geübten Langzeitbehandlung, wird unterbrochen, wenn es peripher zur Blutzellunterzahl kommt. Nach Regeneration kann die Kurzzeittherapie wiederholt werden (40).

In einem weiteren Vortrag berichtete STORTI über die erfolgreich angewandte Kurzzeittherapie mit sogar 6-11 mg/kg/die Azathioprin bei meist kindlicher, akuter lymphatischer Leukämie (41).

Hinweisend auf eine Untersuchung von RUNDLES (36), daß das Azathioprin eine spezifische Wirkung auf die Proliferation von normalem granulocytären und auf die von leukämischem Gewebe hat, betont STORTI den besonderen Wert der Anwendung des Azathioprin in dieser Indikation. Vor allem die klinischen Behandlungsergebnisse mit Azathioprin weisen auf eine direkte Beeinflussung des Knochenmarks durch dieses Medikament hin, da jede Form der Leukämie primär eine neoplastische Erkrankung des Knochenmarks ist (16, 17, 36, 40, 42).

Bemerkenswert sind die Ergebnisse von STORTI insofern, als es trotz hoher Dosierungen nicht zur irreversiblen Schädigung der blutbildenden Organe kommt (40). Die allgemeine Erfahrung lehrt, daß die therapeutische Wirkung aller Cytostatica, in erster Linie dosisabhängig, nach oben begrenzt ist durch die toxische Wirkung auf normale Gewebe mit starker Proliferationstendenz, wie es die Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes, die Gonaden und vor allem das hämatopoetische System sind. Geschädigt werden dabei hauptsächlich die in der Interphase befindlichen Zellen; denn gerade diese Periode des Zellzyklus ist bei schnellwachsenden Geweben, wie dem blutbildenden, von großer Bedeutung. Da die Schädigung im Desoxyribonucleinsäurestoffwechsel auftritt - bekanntlich findet während der Interphase die Synthese der Chromosomen statt - gehört das Azathioprin zur Gruppe der kernschädigenden Cytostatica, woraus sich die Bezeichnung "Chromosomengifte" ableitet (13, 24).

Chromosomenveränderungen, wie Brüche, Abspaltungen und Verklumpungen, konnte EBERLE in klinischen Vergleichsuntersuchungen zwischen einer Patientengruppe, die unter einer Azathioprindosis von 1,5-2,5 mg/kg/die stand, und einer unbehandelten Probandengruppe nicht feststellen (14). KROGH-JENSEN und SØBORG fanden jedoch unter ähnlichen Versuchsbedingungen signifikante Werte von Chromosomenveränderungen (31).

HUNSTEIN prüfte die myelotoxische Wirkung des Azathioprin in

tierexperimentellen Langzeitversuchen. Er applizierte Ratten i. p. steigende Dosen von Azathioprin, wobei nach 150 mg/die eine drastische Steigerung der Todesrate auftrat. Die Knochenmarkuntersuchungen von HUNSTEIN führten zu folgenden Ergebnissen: Morphologisch faßbare Markveränderungen konnten erst in sehr hohen Dosisbereichen festgestellt werden. Der Befund ergab typisch akute Dystrophien, temporäre umschriebene Fibrosen und am Ende des Versuches eine erhebliche Steigerung der Zelldichte im Sinne einer Hyperplasie, deren Auftreten die Autoren nur schwer zu interpretieren vermögen (27).

In vivo-Knochenmarkuntersuchungen von GERHARTZ und WEISE bei 7 mit 250 mg/die Azathioprin behandelten Patienten mit chronischen Lebererkrankungen erbrachten eine geringe Minderung und Linksverschiebung der Granulopoese, während Plasmazellen und die lymphoiden Retikulumzellen auf 50% ihres Ausgangswertes absanken. Anzeichen für eine Fibrosierung des Knochenmarks waren auch nach langfristigen Azathiopringaben nicht zu erkennen (23).

Um ohne Beeinflussung durch nervale und humorale Faktoren die Wirkung des Azathioprin auf das menschliche Knochenmark zu untersuchen, prüften wir nun den Effekt von Azathioprin auf die Knochenmarkkultur.

Neben Koagulumkulturen, die ohne Zusatz von Azathioprin der Kontrolle dienen, wurden Kulturen mit Azathioprin von unterschiedlicher Konzentration angelegt. Anhang von Reifungskurven der Knochenmarkkulturen, von Mitose-Indices und karyologischen Kurven werden Reifung und Regeneration in vitro beurteilt. Anschließend soll auf Grund dieser Ergebnisse ein Vergleich gezogen werden zwischen der Wirkung des Azathioprin und der des 6-MP auf menschliches Knochenmark, basierend auf einer entsprechenden in vitro-Untersuchung von KLIMAS (28).

II. Methode

Die von BOLL und FUCHS beschriebene Deckglasmethode, in Anlehnung an die CARREL'sche Technik der Gewebezüchtung im hängenden Tropfen, benutzen wir zur Kultivierung von menschlichem Knochenmark (5). Auf ein handelsübliches Deckglas wird ein koagulierender Tropfen pipettiert, der aus 50% Patientenplasma, 40% Hank'scher Lösung und 10% Corhormon[®] besteht. Die Mischung muß stets 33-50% Plasma enthalten, um gerinnen zu können. Dem geronnenen Koagulum wird ein durch Sternalpunktion gewonnener Knochenmarkbröckel aufgesetzt und ein kleiner Serumtropfen überschichtet, damit die Zellen nicht austrocknen. Die Kultur wird nun mit einem Hohlschliffträger und Paraffin luftdicht verschlossen und anschließend gedreht, daß der Tropfen hängt. Das Ansetzen der Kulturen soll unter sterilen Bedingungen erfolgen.

Die Deckglaskulturen werden mit verschiedenen Zusätzen beschickt:

1. Kontrollkulturen ohne Zusatz
2. Kulturen mit 0,05 mg% Azathioprin
3. Kulturen mit 0,1 mg% Azathioprin
4. Kulturen mit 0,5 mg% Azathioprin

Bei 37°C werden diese Kulturen im Brutschrank inkubiert, anschließend Ausstrichpräparate nach 24, 48 und 72 Stunden angefertigt, fixiert und nach Pappenheim panoptisch gefärbt. Daneben werden direkt nach den Knochenmarkpunktionen Originalausstriche angefertigt.

Von 2 Patienten mit leukämischen Erkrankungen wird peripheres Blut, das sich wegen seines Zellreichtums (bis zu 67000³ Leukozyten pro mm³ Blut) eignet, zu Flüssigkeitskulturen für 24 Std., im anderen Fall für 48 Std. verwendet. Das Medium besteht neben der Plasma/Zellsuspension aus einer Mischung von TC Eagle⁺, Corhormon[®] und Antibiotikaspuren.

⁺) Präparat der Fa. Disco, Detroit (USA).

Je nach Qualität des Ausstrichpräparats (durch die Ausstrichtechnik trocknen die einzelnen Knochenmarkbröckel nicht gleichmäßig auf und sind dadurch unterschiedlich gut differenzierbar) konnten im Stichprobenverfahren zwischen 500 und 3000 Zellen pro Präparat in mäanderförmiger Zählweise in den lockeren Randgebieten der Kulturen ausgewertet werden.

Die rote Reihe wird differenziert in:

- Proerythroblasten (PE)
- basophile Erythroblasten (bE)
- polychromatische Erythroblasten (pE)
- oxyphile Erythroblasten (oE)
- reife Erythroblasten (rE)

und die weiße Reihe in:

- Myeloblasten (MB)
- Promyelocyten (PM)
- neutrophile (MC), eosinophile (eMC), basophile Myelocyten (bMC)
- Promonocyten (PMo)
- Metamyelocyten (MM)
- neutrophile stabkernige Granulocyten (StG)
- neutrophile (SG), eosinophile (eSG), basophile Granulocyten (bSG)
- Monocyten (Mo)

In der Erythropoese sollen die 5 Reifungsstufen näher charakterisiert werden:

- 1) Der Proerythroblast PE ist die jüngste und größte Zelle der roten Reihe. Der runde Kern besitzt ein dichtes, feinkörniges Chromatinnetz. Er ist von einem gleichmäßig schmalen, dunkelbasophilen Cytoplasmasaum umgeben, der häufig an einer Stelle eine Aufhellungszone zeigt.
- 2) Die grobschollige Kernstruktur des kleineren basophilen Erythroblasten bE läßt ein radspeichenähnliches Bild entstehen. Die Kern/Plasmarelation verschiebt sich zugunsten des dunkelblauen Cytoplasmas.

3) Der polychromatische Erythroblast pE ähnelt in Zellgestalt und Kernstruktur dem basophilen Erythroblasten. Durch progressive Hämoglobinisierung entsteht je nach Reife eine blau-grauviolette Mischfarbe des Cytoplasmas.

4) Bei dem oxyphilen Erythroblasten oE kommt es parallel zur Reduktion der Kerngröße zu einer weiteren Verdichtung des Kernchromatins. Das Cytoplasma zeigt die Farbe der Erythrocyten.

5) Reifer Erythroblast rE: Bei dem jetzt kleinen, meist exzentrisch liegenden, pyknotischen Kern kann man keine Struktur mehr erkennen. Sein Cytoplasma kann Erythrocytenfarbe aufweisen, aber auch dem Plasma eines basophilen oder polychromytischen Erythroblasten ähneln.

Die Proerythroblasten und alle anderen Erythroblasten bis auf die reifen werden als teilungsfähig angesehen.

Die Differenzierung der granulopoetischen Zellen erfolgt nach dargelegten Kriterien (6):

1) Die jüngste Zelle der Granulopoese ist der Myeloblast MB. Sein Kern ist oval oder rund. Durch eine besonders feinfädig, engmaschig gefügte Chromatinstruktur erscheint der Kern verwaschen. Ein schmaler, hellblauer, ungranulierter Cytoplasmasaum umgibt den Kern. Deutlich sichtbar sind meist 2-3 Nucleoli im Kern.

2) Der Promyelocyt PM ist die größte Zelle der weißen Reihe und fällt auf durch grobe, azurophile, dunkelrote Granula. Im Vergleich zum Myeloblasten ist der Cytoplasmasaum breiter und weniger basophil. Der ovale Kern ist oft einseitig abgeflacht, Nucleoli (2-3) sind meist nur angedeutet.

3) Der neutrophile Myelocyt MC zeigt an Stelle der azurophilen Granulation eine neutrophile, auch sind die Granula feiner geworden. Die jetzt im ganzen kleinere Zelle besitzt einen oft eingebuchteten Kern mit einem dichten Chromatingerüst. Das Cytoplasma ist von zarter grau-rosa Farbe, eine Basophilie ist nicht mehr sichtbar.

4) Der eosinophile eMC und basophile Myelocyt bMC fallen auf durch eosinophile bzw. basophile Granula, die, von grober, plumper Gestalt, Kern und Plasma weitgehend überdecken.

- 5) Der Promonocyt PMo ähnelt in seiner Größe dem Promyelocyten. Häufig zeigt der Kern eine einseitige Einbuchtung, das Kernchromatin erscheint locker und beginnend grobfädig. Charakteristisch ist das weite, rauchgraue Cytoplasma mit zarter Azurgranulation.
- 6) Der Zellkern des Metamyelocyten MM ist von wechselnd eingebuchteter Gestalt, zeigt jedoch in Plasmafärbung und Granulation eine große Ähnlichkeit mit dem Myelocyten.
- 7) Der stabkernige Granulocyt StG ist charakterisiert durch die Ausbildung einer C- oder S-förmigen Kernform ohne erkennbare Schnürfurchen. Eine Vergrößerung der Chromatinschollen läßt die Kernstruktur dichter erscheinen als bei dem Metamyelocyten.
- 8) Bei dem neutrophilen segmentkernigen Granulocyten SG sind jetzt im Kern deutlich erkennbar fadenförmige Einschnürungen, so daß in der Regel 3-4 Segmente entstehen.
- 9) Die Kerne der eosinophilen eSG und basophilen segmentkernigen bSG Granulocyten sind überwiegend doppelt segmentiert, verbunden durch eine feinfädige Segmentbrücke. Die eosinophilen bzw. basophilen Granula bedecken Kern und Plasma gleichmäßig.
- 10) Der Monocyt Mo ist die größte Zelle des peripheren Blutes. Neben dem charakteristisch rauchgrauen Cytoplasma fällt ein großer, gelappter, vielgestaltiger Kern auf, der mit lockerem, grobfädigem Chromatin insgesamt transparent erscheint. Nucleolen sind nicht erkennbar.

Zu den teilungsfähigen Zellen der weißen Reihe werden Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten und Promonocyten gerechnet.

Die Mitosen der Metamyelocyten lassen sich lediglich im Stadium der Prophasen von den Mitosen der Myelocyten unterscheiden. Insofern haben wir die Metamyelocyten bei der Berechnung der Mitose-Indices nicht berücksichtigt.

Aus dem retikulohistiozytären System unterscheiden wir Plasmazellen und Retikulumzellen:

Die Plasmazelle ist von länglich ovaler Gestalt und besitzt einen meist exzentrisch liegenden kreisrunden Kern. Das grobtropfige Kernchromatin

mit schmalen, hellen Felderungen läßt das Bild einer Radspeichenstruktur entstehen. Im charakteristisch kornblumenblau gefärbten Cytoplasma finden sich häufig Vakuolen von unterschiedlicher Größe.

Die große Retikulumzelle besitzt einen rund-ovalen, blaßroten Kern mit auffallend feinfädiger und lockerer Chromatinstruktur. Die Cytoplasmagrenzen sind im panoptisch gefärbten Präparat meist nicht erkennbar. Hin und wieder findet man intraplasmatische Einlagerungen von phagozytiertem Material.

Die kleinere "lymphoide" Retikulumzelle ist von profiliierterer länglich-ovaler Kerngestalt, seine Kernchromatinstruktur von intensiverer roter Farbe als der Zellkern der "großen" Retikulumzelle. Phagozytose läßt sich bei den kleinen Retikulumzellen nicht beobachten.

Neben der Differenzierung der morphologisch unterscheidbaren Zellklassen ist es wichtig, die einzelnen Mitosephasen gegeneinander abzugrenzen (7):

1) Prophase (P):

Die Kernmembran ist aufgelöst, die Nucleoli sind verschwunden.

Die aufgelockerten Chromosomen sind noch zu einem festen Spirem angeordnet.

2) Frühe Metaphase (fM):

Unter ungeordneter Verstreuung der Chromosomen über die Zelle ist ein lockeres Spirem entstanden.

3) Späte Metaphase (sM):

Die Chromosomen verdoppeln sich und sind sternförmig zum Monaster bzw. zur Äquatorialplatte angeordnet.

4) Anaphase (A):

Die formierten Chromosomen bilden 2 Platten oder Aster.

5) Telophase (T):

Die Chromosomen sind zu einem lockeren Dispirem geordnet, das Zellplasma zeigt Taillenbildung verschiedenen Ausmaßes.

6) Rekonstruktionsphase (R):

Die Zelle ist durchgeschnürt, die Chromosomen der sich spiegelbildlich gleichenden Tochterzellen liegen in festem Dispirem.

Kernmembran und Nucleolen sind noch nicht wieder ausgebildet.

Aus den Differentialzählungen werden Reifungskurven und karyologische Kurven aufgestellt, sowie der Mitose- und G/E-Index bestimmt. Während die Reifungskurven die prozentuale Verteilung der Zellformen, getrennt für Erythro- und Granulopoese, während dreier Kulturtage wiedergeben, zeigen die karyologischen Kurven in graphischer Darstellung die prozentuale Mitosephasenverteilung. Unter Mitose-Index wird die Anzahl aller gefundenen Mitosen auf die Gesamtzahl aller gezählten, teilungsfähigen Zellen verstanden (6). Die Mitose-Indices werden in Promille ausgedrückt. Der G/E-Index, das Verhältnis der gezählten Granuloblasten und Granulocyten zu allen Erythroblasten, gibt Aufschluß über das relative Verhalten der Granulopoese zur Erythropoese.

In den Reifungskurven bedeuten (Abb. 1 bis 6):

————— = Kontrollkulturen ohne Zusatz

----- = Kulturen mit Azathioprinzusatz

In den karyologischen Kurven der Mitosephasenverteilung bedeuten (Abb. 7):

————— = Mitosen in Kontrollkulturen

1. Erythropoese : 173 Mitosen

2. Granulopoese : 158 Mitosen

----- = Mitosen in den Azathioprinkulturen

1. Erythropoese : 79 Mitosen

2. Granulopoese : 87 Mitosen

Wegen zu geringer Zahlen wurden alle Zusatzkultur-Mitosen beider Konzentrationen zusammengefaßt.

In den Abb. 8 und 9 bedeuten:



= Kontrollkulturen ohne Zusatz



= Kulturen mit Azathioprinzusatz

Um zu prüfen, ob abweichende Zellverteilungen unserer Differentialzählungen zufallsbedingt oder signifikant unterschieden sind, wird der χ^2 -Test nach HELMERT PEARSON durchgeführt (20).

Folgende Bezeichnungen werden dabei angewandt:

a = Zellzahl der Kulturen mit Azathioprinzusatz

b = Zellzahl in den Kontrollkulturen

$$m = \frac{a + b}{2} \quad (\text{Erwartungswert})$$

Bei zu großen Differenzen in den Summen von a und b wird

der Faktor $\frac{\text{Summe a}}{\text{Summe a} + \text{Summe b}}$ bestimmt, der dann mit

der Summe der einzelnen Zellformen (a + b) multipliziert wird.

Dieser Faktor steht hinter "m".

Δ = Differenz a - m (absoluter Wert).

$$\chi^2 = \text{Summe der Einzelergebnisse} \quad \frac{\Delta^2}{m} \quad .$$

Für die weiße Reihe mit 10 differenzierten Zellformen ist die Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% bei $\chi^2 = 20$ gegeben, in der roten Reihe mit 5 Parametern bei gleicher Irrtumswahrscheinlichkeit bei $\chi^2 = 13$.

III. ERGEBNISSE

A. Zellmorphologie:

In den Originalausstrichen finden sich nur geringe morphologische Veränderungen der einzelnen Zellarten. Vermehrt treten jedoch Veränderungen nach längerer Bebrütung in den Knochenmarkkulturen auf. Nicht immer lassen sich dabei Fixierungsschäden von degenerativen Erscheinungen trennen. In den Zusatzkulturen mit einer Azathioprinkonzentration von 0,05 mg% beobachtet man ein gehäuftes Auftreten der Zellveränderungen schon nach 24-stündiger Kulturzeit. Die höhere Konzentration von 0,1 mg% Azathioprin erbringt dagegen keine neuen Ergebnisse. Die Knochenmarkkulturen, die mit einer Azathioprinkonzentration von 0,5 mg% angelegt wurden, können nicht ausgewertet werden, da bereits nach 24-stündiger Bebrütung eine weitgehende Zellzerstörung vorliegt.

An pathologischen Kernveränderungen werden beobachtet:

verwaschene, aufgelockerte Kernstrukturen, unscharf begrenzte, z.T. aufgelöste Kernmembranen, Atypien der Kernformen; in den Zusatzkulturen erscheint das Kernchromatin häufig grobschollig, auch Übersegmentierungen treten auf. Die Kernteilungsfiguren wirken besonders unter Azathioprineinfluß durch Verklumpungen der Chromosomen grobgestaltig und plump. Eine Besonderheit in der roten Reihe ist die "Gänseblümchenform" der polychromatischen Erythroblasten, evtl. als Ausdruck beginnender Karyorrhexis oder pathologisch veränderte Mitosefigur zu werten.

An Cytoplasmaveränderungen treten auf: Körnelung des Plasmas, Vergrößerung der Granulation, in den Zusatzkulturen teilweise auch toxische Granulation.

B. Differentialzählungen der Knochenmarkzellen:

Die erste Untersuchungsreihe (Tab. 1 u. 2, Abb. 1) wird an dem Sternalmark der 54-jährigen Patientin D.B. (Fall 1) durchgeführt. Die klinische Diagnose lautet: chronische Pyelonephritis, chronischer

Tablettenabusus, Migräne. Zur Zeit der Sternalpunktion zeigt das Blutbild eine mäßige Anämie.

Das Myelogramm des Originalausstriches läßt eine normoblastische Erythropoese erkennen. In der Granulopoese sind die Promyelocyten und segmentkernigen Granulocyten etwas vermehrt. Der G/E-Index mit dem Wert 2 ist erniedrigt.

Betrachtet man die Reifungskurven der Kontrollkulturen während der 3-tägigen Bebrütungsdauer, fällt in der Granulopoese das Überwiegen der teilungsfähigen Granuloblasten nach 24 und 48 Std. auf. Nach 72 Std. zeigt sich eine beschleunigte Ausreifungstendenz.

Signifikante Abweichungen der Zellverteilung ergeben sich nach Zusatz von 0,05 mg% Azathioprin an den ersten beiden Kulturtagen. Nach 24 Std., stärker noch nach 48 Std., sind im Gegensatz zur Kontrolle unter Verminderung der Granuloblasten die reifen, weißen Zellen relativ vermehrt. Nach 72 Std. sind nur die Promyelocyten stärker als in der Kontrolle vermindert, alle anderen Zellformen haben sich den Kontrollwerten angeglichen.

In der Erythropoese findet sich nach 24-stündiger Kulturzeit gegenüber dem Originalausstrich eine Verminderung der Proerythroblasten und polychromatischen bei geringer prozentualer Vermehrung der basophilen und reifen Erythroblasten. Abgesehen von einer geringen prozentualen Zunahme der Proerythroblasten beobachtet man nach 48 Std. allgemein eine Zellverschiebung zu den reiferen Zellformen. Am 3. Kulturtag reifen Proerythroblasten und basophile weiter aus, die übrigen Erythroblasten bleiben annähernd ihrem 48-Stundenwert verteilt.

Die Zusatzkulturen mit 0,05 mg% Azathioprin weichen nur wenig von den Kontrollkulturen im Verlauf von 48 Std. Kulturzeit ab. Nach 72 Std. sind die reifen Erythroblasten stärker als in den Kontrollen vermehrt und bedingen zusammen mit der relativen Abnahme der oxyphilen Erythroblasten am stärksten die Signifikanz.

Die zweite Untersuchungsreihe (Tab. 3 u. 4, Abb. 2) wird mit dem Knochenmark der 77-jährigen Patientin F.W. (Fall II) durchgeführt.

Nach Entfernung eines Tonsillen-Ca wurde die Diagnose einer chronischen Hepatitis gestellt. Zur Zeit der Beckenkampnpunktion zeigt das Blutbild eine mäßige Anämie bei normaler Leukozytenzahl.

Das Myelogramm des Originalausstriches zeigt eine etwa normoblastische Erythropoese. In der weißen Reihe fallen mit jeweils 30% relativ große prozentuale Anteile sowohl an Promyelocyten als auch an neutrophilen segmentkernigen Granulocyten auf. Der G/E-Index ist 4,2.

Bei Betrachtung der Reifung der Granulopoese in vitro zeigt sich nach 24-stündiger Bebrütungszeit in den Kontrollkulturen gegenüber dem Originalausstrich eine geringe Abnahme der Gesamtzahl der Granuloblasten. Unter Verminderung der stabkernigen Granulocyten wird die Vermehrung der neutrophilen Segmente deutlich. Während es am 2. Kulturtag nur zu einer weiteren Verminderung der Promyelocyten kommt, zeigt sich eine relative Vermehrung aller anderen teilungsfähigen Zellen - und dadurch bedingt - eine prozentuale Verminderung der reifen Zellen. Nach 72 Std. sind wieder die reifen Granulocyten vermehrt.

Der Zusatz von 0,05 mg% Azathioprin bewirkt nach 24 Std. eine signifikante Abweichung der Reifungskurven von denen der Kontrolle. Die erhöhte Abnahme der prozentualen Gesamtzahl der Granuloblasten ist bedingt durch die Verminderung besonders der Promyelocyten bei deutlicher Vermehrung der stab- und segmentkernigen Granulocyten. Nach 48 Std. ergeben sich keine auffallenden Veränderungen im Reifungsverlauf; Abweichungen von den Kontrollen müssen als zufallsbedingt angesehen werden. Eine relative Verminderung der Metamyelocyten sowie eine relative Vermehrung der eosinophilen Segmente bedingen hauptsächlich die Signifikanz nach 72 Std.

In der Erythropoese zeigt sich eine zeitabhängige Verminderung aller teilungsfähigen Erythroblasten. Nach den 3 Kulturtagen ist in der Zellverteilung eine kontinuierliche Verschiebung zu den reiferen Zellformen erkennbar.

Nach dem Zusatz von 0,05 mg% Azathioprin sieht man in dem 24-Stundenausstrich eine signifikant veränderte Zellverteilung:

Während Proerythroblasten und basophile Erythroblasten stark vermehrt erscheinen, hat sich die prozentuale Verteilung der oxyphilen und reifen Erythroblasten nur unwesentlich gegenüber dem Sofortausstrich verändert. Nach 48 Std. erreichen nur die Proerythroblasten den Kontrollwert, alle übrigen teilungsfähigen roten Zellen bleiben gegenüber der Kontrolle signifikant vermehrt. Der relativ hohe Anteil der polychromatischen, sowie die Zunahme der oxyphilen Erythroblasten unter Verminderung der reifen Zellen bedingen die von den Kontrollen signifikant abweichenden 72-Stundenwerte.

Die dritte Untersuchungsreihe (Tab. 5, Abb. 3) wird an einer Blutkultur der 67-jährigen Patientin J. V. (Fall III) durchgeführt, die an chronisch myeloischer Leukämie seit 3 Jahren leidet. Das Blutbild zur Zeit der Punktion zeigt eine zurückgedrängte Erythropoese und eine Leukozytose von 10 400 Leukozyten pro mm³.

Im Originalblutausstrich und in den Kulturpräparaten während zweier Kulturtage fanden sich so wenig rote Zellen, daß in diesem Fall nur die Granulopoese ausgewertet werden konnte.

Im originalen Hämatogramm zeigt sich eine vermehrte, linksverscho-bene Granulopoese bei einem Mitose-Indexwert von 8,2‰.

Nach 24-stündiger Kulturzeit werden im Kontrollpräparat bei geringer Verminderung der Metamyelocyten und stabkernigen Granulocyten die Segmente relativ vermehrt. Erst nach 48 Stunden werden auch die teilungsfähigen Granuloblasten vermindert, so daß eine allgemeine Ausreifungstendenz deutlich wird.

Nach dem Zusatz von 0,05 mg% Azathioprin werden im 24-Stundenpräparat vorwiegend die Myeloblasten und Promyelocyten vermindert, doch können diese Veränderungen nicht durch eine rechnerische Signifikanz gesichert werden. Die 48-Stundenwerte sind denen der Kontrolle wieder angeglichen.

Die vierte Untersuchungsreihe (Tab. 6 u. 7, Abb. 4) wird an einer Blutkultur der 50-jährigen Patientin G.L. (Fall IV), die seit zirka 2 Jahren an Osteomyelosklerose leidet, durchgeführt. Das Blutbild zeigt eine zurückgedrängte Erythropoese und eine Leukozytose von $67000/\text{mm}^3$ mit 21% Myeloblasten. Ein Beckenkammpunktat sicherte die Diagnose einer akuten Myelose bei bekannter Osteomyelosklerose. Im Originalblutausstrich ist eine stark linksverschobene Granulopoese deutlich. Besonders groß ist der prozentuale Anteil an Myeloblasten. Auffällig sind kleine, unreife, "lymphoide" Formen von Myeloblasten, so daß eine Differenzierung in normale Myeloblasten und Mikromyeloblasten vorgenommen wird. Daneben finden sich Erythroblasten aller Reifungsstufen, so daß ein G/E-Index von 9,5 errechnet werden kann. In der Granulopoese läßt sich nach 24 Std. eine Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten und somit eine verstärkte Linksverschiebung gegenüber dem Originalausstrich beobachten.

Die Änderungen der Zellverteilung in der Zusatzkultur mit 0,05 mg% Azathioprin ergeben keine signifikanten Werte, sie müssen somit als zufallsbedingt angesehen werden.

Die Erythroblasten lassen im peripheren Blut nach einer Kulturzeit von 24 Std. eine ähnliche Ausreifungstendenz erkennen, wie sonst im Knochenmark. Bei Vermehrung der Proerythroblasten haben sich basophile und polychromatische Erythroblasten vermindert. In der Azathioprinkultur erscheinen von der Kontrolle abweichende Reifungskurven, die jedoch - bedingt durch eine zu geringe Gesamtzellzahl - keine signifikanten Werte ergeben.

Die fünfte Versuchsreihe (Tab. 8 u. 9, Abb. 5) wird mit dem Sternalmark der 79-jährigen Patientin E.K. (Fall V), die an akuter Myeloblastenleukämie, Emphysebronchitis und chronischer Pneumonie erkrankt war, durchgeführt. Todesursache der 4 Tage nach der Punktion verstorbenen Patientin war eine Bronchopneumonie. Zur Zeit der Punktion zeigt das Blutbild eine Leukozytose von $64000/\text{mm}^3$ und

eine Anämie von 6,8 g% Hb.

Das Myelogramm des Originalausstriches läßt eine starke Linksverschiebung in der Granulopoese erkennen. Auch in der Erythropoese ist durch Vermehrung der Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten eine starke Linksverschiebung deutlich. Der G/E-Index beträgt 2,4, so daß eine Erythroleukämie diskutiert werden muß.

In der Granulopoese findet sich nach 24-stündiger Kulturzeit trotz prozentualer Verringerung der Promyelocyten durch eine Vermehrung der Myelocyten eine Zunahme der Granuloblastenzahl. Nach 48 Std. haben sich die teilungsfähigen weißen Zellen stark vermindert. Diese Veränderungen haben nach 72 Std. weiter zugenommen, wenn auch Myeloblasten und Promyelocyten stärker ausgereift sind als die Myelocyten.

In der Zusatzkultur mit 0,1 mg% Azathioprin werden nach 24 Std. die Granuloblasten vermindert. Die prozentuale Abnahme der Myeloblasten beeinflußt dabei die Signifikanz am stärksten. Während am 2. Kulturtag die Myeloblasten und Promyelocyten die Kontrollwerte erreichen, beobachtet man eine signifikante Vermehrung der Myelocyten gegenüber der Kontrolle. Im 72-Stundenausstrich ergeben sich keine weiteren Veränderungen, die durch signifikante Werte zu sichern sind.

Die stark linksverschobene originale Zellverteilung der Erythropoese läßt nach 24-stündiger Kulturzeit, deutlicher nach 48 und 72 Std., eine ausgeprägte Verschiebung zu den reiferen Erythroblasten erkennen.

Unter Azathioprineinfluß zeigen sich nur am 1. Kulturtag signifikante Abweichungen: Unter prozentualer Verringerung der polychromatischen Erythroblasten kommt es zu einer starken Vermehrung der reifen roten Zellen. Nach 48 Std. nähern sich die Reifungskurven denen der Kontrolle. Abweichende Zellverteilungen nach 72-stündiger Bebrütung sind zufallsbedingt.

Da sich bei der Patientin E.K. sowohl in der Granulo- als auch in der Erythropoese ein stark linksverschobenes Myelogramm darstellt,

deuten wir das hier vorliegende "gemischte" Krankheitsbild als Erythroleukämie. Die akut leukämischen Zeichen treten in diesem Fall in nicht so ausgeprägtem Maße in Erscheinung. Der gefundene originale Myeloblastenwert liegt mit 31% etwas unter dem Erwartungswert von 50% bei akuten Leukosen. Vor allem aber der niedrige G/E-Index von 2,4 unterstreicht die erhöhte Proliferation der Erythropoese neben der leukämischen Entartung der Granulopoese. Bei akuter Leukämie allein erreicht der G/E-Index sonst unter Zurückdrängung der Erythropoese einen durchschnittlichen Wert von 70,9.

Die sechste Versuchsreihe (Tab. 10 u. 11, Abb. 6) wird mit dem Sternalmark des 35-jährigen Patienten H. T. (Fall VI) durchgeführt. Später konnte ein Morbus Hodgkin diagnostiziert werden. Das Blutbild zur Zeit der Punktion zeigt eine Eosinophilie, sonst ist es unauffällig.

Abgesehen von einer Vermehrung der eosinophilen Myelocyten und der eosinophilen Segmente lassen sich im Myelogramm des Originalausstrichs keine Abweichungen im Reifungsverlauf der "normalen" Granulo- und Erythropoese erkennen. Der G/E-Index ist 3,6.

In der Granulopoese kommt es nach 24-stündiger Bebrütung zu einer geringen Vermehrung der Promyelocyten. Gleichzeitig werden unter Reduzierung der stabkernigen Granulocyten die neutrophilen und die in diesem Fall besonders stark vertretenen eosinophilen Segmente vermehrt. Nach 48 Std. zeigen sich nur geringfügige Änderungen in der Zellverteilung. Erst am 3. Kulturtag erkennt man bei geringer prozentualer Vermehrung der Granulocyten eine gewisse Ausreifungstendenz. Eine Abnahme der eosinophilen Segmente hat zusätzlich den relativen Anteil der neutrophilen Segmente erhöht.

Die Reifungskurven der mit 0,1 mg% Azathioprin versetzten Kulturen zeigen zu allen Bebrütungszeiten signifikante Abweichungen von den Kontrollkurven. Nach 24 Std. beobachtet man unter Azathioprineinfluß eine starke Vermehrung aller Granuloblasten, auch der stabkernigen Granulocyten bei Verminderung der neutrophilen und eosinophilen segmentkernigen Granulocyten. Dabei beeinflußt die Abnahme

der Segmentkernigen den signifikanten χ^2 -Wert am stärksten. In der 48-Stundenkultur tendieren die Zellen zur Ausreifung, doch bleibt der Anteil der weniger differenzierten Zellen gegenüber der Kontrolle vermehrt. Nach 72 Stunden nähern sich die Reifungskurven denen der Kontrolle.

In der Erythropoese läßt sich nach 3-tägiger Kulturzeit eine fortschreitende Verschiebung der Erythroblasten zu den mehr differenzierten Zellformen beobachten. Der Verlauf der Erythroblastenausreifung zeigt unter Azathioprineinfluß zu keiner Zeit eine signifikante Abweichung von den Kontrollkurven. Die Zellverteilung folgt der zeitabhängigen Verschiebung zu den reiferen Erythroblasten.

C. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Reifungskurven:
(Tab. 1 - 11, Abb. 1 - 6)

In den Kontrollkulturen der Granulopoese beobachtet man in 4 von 6 Fällen eine Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten nach 24 Stunden. (Im Fall II kommt es zu einer geringen Granuloblastenverminderung, im Fall III entspricht die Zellverteilung nach 24 Stunden dem originalen Zellbild.) Nach 48 Stunden, deutlicher nach 72 Stunden, zeigt sich eine generelle Zellausreifung, die in den 48-Stundenausstrichen mitunter nur durch eine Promyelocytenverminderung gekennzeichnet ist.

In den Fällen mit etwa normalem Knochenmark führt der Zusatz von 0,05 mg% Azathioprin (Fall I und II) nach 24 Stunden zu einer signifikanten Reifungsbeschleunigung, die sich im Fall I bis 48 Stunden, im Fall II bis 72 Stunden signifikant errechnen läßt. Unter der Azathioprinkonzentration von 0,1 mg% kommt es (Fall VI) zu einer signifikanten Reifungshemmung bis 48 Std.

In den Blutkulturen zweier Leukämiepatienten (Fall III und IV) werden unter der Konzentration von 0,05 mg% Azathioprin keine von den Kontrollen signifikant abweichenden Zellverteilungen gefunden.

Im leukämischen Knochenmark des Fall V läßt sich nach 24 Stunden

eine signifikante Reifungsförderung beobachten, die nach einer Latenzzeit von mehr als einem Tag in eine signifikante Reifungshemmung umschlägt, die sich noch nach 72 Stunden, wenn auch nicht mehr signifikant, ausprägt.

In der Erythropoese haben die Zusätze von 0,05 mg% und 0,1 mg% Azathioprin jeweils nur in einem Fall einen signifikanten Einfluß auf die Zellreifung:

0,05 mg% Azathioprin führt im Fall II (mit etwa normalem Knochenmark) während dreier Kulturtage zu einer signifikanten Reifungshemmung.

Nach dem Zusatz von 0,1 mg% Azathioprin kommt es im erythroleukämischen Mark des Falls V in der 24-Stundenkultur zu einer signifikanten Reifungsförderung, die sich nach weiteren 2 Kulturtagen nicht mehr beobachten läßt.

D. Mitose-Indices (Tab. 12 u. 13).

Die Berechnung der Mitose-Indices der Azathioprinreihe zeigt, daß nach 24 Stunden (mit Ausnahme der Fälle III und V), unabhängig von der Höhe der Konzentration, die MI der weißen Reihe herabgesetzt werden. Diese Veränderungen sind nur im Fall II auch noch nach 48 Stunden deutlich.

In den Fällen III und V sind die 24-Stundenwerte der Mitose-Indices gegenüber der Kontrolle leicht erhöht. Nach 48 Stunden werden im Fall III weder in der Kontroll- noch in der Zusatzkultur Mitosen gefunden, während die um 70% unter den Kontrollen liegenden 48- und 72-Stundenwerte des Falls V auf eine deutlich herabgesetzte Regenerationsaktivität hinweisen.

In der roten Reihe kommt es unter dem Azathioprineinfluß von 0,05 mg% in den Fällen I und II zu einer verminderten Regeneration bis 48 Stunden. Unterschiedliche Reaktionen zeigen sich am 3. Kulturtag: Im Fall I kommt es zu einer weiteren Herabsetzung der Regeneration, Fall II

reagiert mit einer geringen Erhöhung. Nach dem Zusatz von 0,1 mg% Azathioprin wird im Fall V nach 24 und 72 Stunden eine herabgesetzte Regenerationsaktivität deutlich, während der 48-Stundenwert kaum eine Änderung erfährt. Im Fall VI kommt es nach 24 Stunden zu keinem auffallend abweichenden Mitose-Indexwert, im Gegensatz zu der Kontrolle läßt sich jedoch nach 48 Stunden keine Kernteilung mehr beobachten. Nach 72 Stunden sind weder in der Kontroll- noch in der Zusatzkultur Mitosen zu finden.

E. Karyologische Kurven (Abb. 7):

Die karyologischen Kurven zeigen unter Azathioprineinwirkung keine Abweichungen in der Mitosephasenverteilung.

Eine Berechnung der Mitose-Indices der einzelnen Reifestufen ergibt, daß durch den Azathioprinzusatz bedingte Änderungen der Mitoseaktivitäten gleichmäßig alle Zellarten betrifft. Somit läßt sich eine spezifische Wirkung des Azathioprin auf eine bestimmte Zellart ausschließen.

F. G/E-Indices (Tab. 14):

Die G/E-Indices der Knochenmarkproben zeigen in den Originalausstrichen unterschiedliche Werte. Durch die Einwirkung des Azathioprin läßt sich unter keiner Konzentration eine deutliche Veränderung beobachten, die auf eine quantitative Verschiebung innerhalb des roten und weißen Zellsystems, bedingt durch den Pharmakonzusatz, schließen läßt.

G. Retikulumzellen (Abb. 8) und Plasmazellen (Abb. 9):

Aus den Differentialzählungen der Kontroll- und Zusatzkulturen werden lymphoide Retikulumzellen und Plasmazellen gesondert berücksichtigt: Abb. 8a zeigt in drei Kolumnengruppen den Anteil der lymphoiden kleinen Retikulumzellen in ‰-Werten nach 24, 48 und 72 Stunden aus den Kontrollpräparaten wie aus den Zusatzkulturen unter der Azathioprin-

konzentration von 0,05 mg%, Abb. 8b die Verteilung unter der Konzentration von 0,1 mg%. In Abb. 8c ist für beide Konzentrationen getrennt der Retikulumzellanteil (in Promille der absoluten Zellzahlen) aus der Summe aller Kulturzeiten dargestellt.

Während unter der Konzentration von 0,05 mg% Azathioprin keine eindeutige Änderung der prozentualen Verteilung erfolgt, werden die lymphoiden Retikulumzellen unter der Konzentration von 0,1 mg% um zirka 30% signifikant gemindert (Signifikanzberechnung nach dem "t"-Test (20): $t = 0,34$, $p = 0,5$).

Abb. 9a und b geben in jeweils drei Kolumnengruppen nach 24, 48 und 72 Stunden die Plasmazellwerte in ‰ wieder, Abb. 9c zeigt eine Zusammenfassung der Einzelstundenwerte jeweils getrennt für beide Konzentrationen. Die prozentuale Verteilung der Plasmazellen wird weder durch die Konzentration von 0,05 mg% noch durch die höhere von 0,1 mg% Azathioprin eindeutig geändert.

IV. Diskussion

Es wird an 4 Knochenmark- und 2 Blutkulturen der direkte Einfluß des Azathioprin auf die menschliche Hämatopoese in vitro am normalen Knochenmark und bei myeloischen Leukämien untersucht. Ähnliche Untersuchungen sind uns aus der Literatur nicht bekannt.

Im Hinblick auf die cytostatische Behandlung maligner Tumoren und zur Immunsuppression gewinnt die Frage nach der Toxizität der Cytostatica auf normale Wechselgewebe eine erstrangige Bedeutung. Als Wechselgewebe mit großer Wachstumsleistung stehen beim Erwachsenen die hämatopoetischen Zellsysteme des Knochenmarks, insbesondere die Granulopoese an erster Stelle. An der Proliferationsaktivität der Knochenmarkzellen sollten sich funktionelle Schädigungen morphologisch und kinetisch relativ rasch erkennen lassen.

Das Knochenmarkbild wird bestimmt durch die Proliferationsaktivität, die Regeneration und Differenzierung beinhaltet. Parameter, nach denen wir in unseren Koagulumkulturen veränderte Proliferations-eigenschaften unter Azathioprinzusatz beurteilen, sind Mitose-Indices und Reifungskurven.

Betrachten wir die Ergebnisse der Kultivierung ohne Azathioprin-zusatz in der Granulopoese, so kommt es bei den nicht leukämischen Markproben in den 24-stündigen Kontrollkulturen zu einer Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten. Diesen Effekt führt BOLL auf eine wachstums- und mitoseanregende Wirkung des Corhormons auf die Koagulumkultur und die relativ kurze Lebensdauer der segmentkernigen Granulocyten zurück (nach Lebendbeobachtungen von BOLL 18 Std., nach H^3 -Thymidinmarkierung von FLIEDNER 15 Std.) (7, 18). Nach 48 und 72 Stunden überwiegt die Reifung die anfängliche Regenerationsstimulierung: Die segmentkernigen häufen sich an, da in der Knochenmarkkultur keine Ausschwemmung der reifen Granulocyten möglich ist (5).

Die höchste Konzentration, die wir den Knochenmarkkulturen zusetzten, betrug 0,5 mg% Azathioprin. Die Beurteilung aller Präparate ergibt, daß diese Dosierung die Zellen der Granulo- und Erythropoese irreversibel schädigt. Bereits nach 24-stündiger Bebrütung zeigt das morphologische Bild eine weitgehende Zellzerstörung. Zelltrümmer und Zellpyknosen ermöglichen keine Ausdifferenzierung. Die Konzentrationen von 0,05 und 0,1 mg% Azathioprin hingegen scheinen von etwa gleich starker cytotoxischer Wirkung zu sein.

Da uns Blutspiegeluntersuchungen von Azathioprin nicht bekannt sind, rechnen wir die in der Literatur angegebenen Höchstdosierungen von 6 - 11 mg/kg/die Azathioprin (41) auf mg%-Werte um. Bei einem angenommenen mittleren Körpergewicht von 70 kg erhalten wir mit 0,059 mg% und 0,11 mg% entsprechende Konzentrationen, die wir unseren Kulturen zusetzten. Da wir aber in vivo-Verhältnisse, wie Abbau und Ausscheidung, bei der Rechnung nicht berücksichtigen können, sind die wirksam werdenden Mengen des Pharmakons sicher geringer als den applizierten Dosen entsprechen würden. Andererseits beobachten wir in der Kultur über 3 Tage eine einmalig gegebene Dosierung, während unter einer Azathioprintherapie täglich die gleiche Dosis appliziert wird. In unserer Versuchsanordnung scheint die Wirkung des Azathioprin reversibel.

Die auswertbaren Kulturen von 0,1 - 0,05 mg%, nach BACH (2) eine immunsuppressive Dosis in vitro bei der nichtimmunisierten Maus, zeigen folgende Veränderungen: Der Azathioprinzusatz führt in den 3 untersuchten Fällen mit etwa normalem Knochenmark zu einer nicht signifikanten Regenerationshemmung. Bei gleichzeitiger prozentualer Verringerung der teilungsfähigen Granuloblasten war die ganze Proliferation gehemmt. Im Fall VI zeigen die Kontrollen bereits eine abgeflachte Kurve wie bei beschleunigter Reifung, so daß unter Azathioprinzusatz trotz deutlich verminderter Mitoseaktivität die prozentuale Zunahme der weniger differenzierten Zellen auf eine Reifungsförderung hinweist.

Von besonderem Interesse sind die Ergebnisse, die sich nach dem Zusatz von 0,1 mg% Azathioprin im leukämischen Knochenmark der Patientin E.K. (Fall V) beobachten lassen. Da in diesem Fall das Krankheitsbild einer Erythroleukämie vorliegt, ist das Knochenmarksbild nicht sehr charakteristisch. Die Linksverschiebung in der Granulopoese mit 30% Myeloblasten und 30% Promyelocyten beherrscht jedoch das Bild, auch wenn die Erythropoese vermehrt und ebenfalls sehr linksverschoben ist. Der gefundene Granuloblasten-Mitoseindex des Originalausstrichs liegt mit 29%o höher als die Streubreite von 0 - 23%o (Diss. Gansen, 19) bei akuten Leukosen. Unter dem Azathioprineinfluß zeigte sich am 1. Kulturtag eine Beschleunigung der Reifung bei gleichbleibender Regeneration. Unter Azathioprineinwirkung kommt es also zu einer Proliferationsänderung im Sinne einer Reifungsstimulierung der leukämischen Granulopoese. Die Blutkulturen zeigen keine deutliche Beeinflussung durch Azathioprin, vielleicht durch die reiferen Zellen oder die niedrigere Konzentration bedingt.

Entgegen früheren Meinungen ist die Proliferation bei den akuten Leukämien nicht vermehrt, sondern vermindert (BOLL, 6, 8, 9). Herabgesetzte Regenerationsleistung und Reifungsstörung werden kompensiert durch eine verlängerte Lebensdauer der pathologischen Blasten. Die normale Interkinesedauer von 1,4 Tagen ist auf 16 Tage verlängert. Als Cytostaticum gehört nun das Azathioprin zur Gruppe der Antimetabolite, deren Wirkungsmechanismus DUSTIN beschreibt: Nach der interkinetischen Ruhephase folgt die Zeit der Chromosomenverdoppelung, d.h. der DNS-Synthese, dem Angriffspunkt dieser Cytostatica. Das wirksame Prinzip beruht auf einer Herabsetzung der Mitoserate mit Verlängerung der Interkinesedauer (13). Dadurch werden alle normalen Wechselgewebe mit hoher Regenerationskinetik durch diese Stoffe beeinträchtigt. Auf Grund des angenommenen Wirkungsmechanismus eines Interphasengiftes und der unterschiedlichen Proliferationseigenschaften "normaler" und leukämischer Knochenmarkzellen ist eine Beeinflussung der "normalen" schnell regenerierenden Granulopoese eher zu erwarten und verständlicher als eine

Wirkung auf die Leukämiezellen mit der verminderten Regenerationsfähigkeit. Klinische Ergebnisse widersprechen dem jedoch, da vereinzelt Remissionen von leukämischem Knochenmark unter einer Azathioprintherapie erzielt wurden (17, 36, 40, 41, 42).

Bei unbehandelten Myeloblastenleukämien fanden BOLL und KELLER in vitro eine gute Ausreifung (6). Im Fall V lassen sich nach 48 und 72 Stunden in den Kontrollpräparaten diese stärkere Ausreifung und vermehrte Mitoseaktivität ebenfalls beobachten. Die vermehrte Regenerationsfähigkeit der Promyelocyten und Myelocyten bietet dem Azathioprin jedoch eine breite Angriffsfläche und es kommt später in den Zusatzkulturen trotz herabgesetzter Regeneration zu einer Reifungsförderung, also keiner Proliferationshemmung bis zu 72 Stunden.

Möglicherweise zeigt die Reaktion der Erythroleukämie (Fall V) nach 24 Stunden die Verminderung der leukämischen Zellen und die relative Vermehrung der reiferen Vorstufen den günstigenfalls therapeutisch erreichbaren Effekt. Der 24-Stundenausstrich der Blutkultur der Promyelocytenleukämie (Fall III) zeigt eine nur geringe Verminderung der pathologischen Myeloblasten und Promyelocyten bei erhöhter Regenerationsleistung, wenn auch durch zu kleine Gesamtzellzahl keine signifikanten Werte für die Reifungsförderung durch Azathioprin errechnet werden konnten.

Die wechselnden Regenerationseigenschaften des Fall V zeigt die folgende Tabelle in Gegenüberstellung der Einzelmitose-Indiceswerte aus den Kontroll- und Zusatzkulturen auf:

	<u>Kontrolle</u>		<u>Azathioprinzusatz</u>
0 Std.:	29%o (MB: 3%o, PM: 15%o, MC: 12%o)		
24 Std.:	MB	2,0%o	6,5%o
	PM	0,0%o	12,0%o
	MC	10,0 %o	11,0%o
48 Std.:	MB	0,0%o	0,0%o
	PM	20,0%o	5,0%o
	MC	28,0%o	8,0%o
72 Std.:	MB	0,0%o	0,0%o
	PM	23,0%o	0,0%o
	MC	20,0%o	10,0%o

(Die MC-Mitose-Indices beinhalten auch die Mitosen der eMC.)

Wir finden hier ebenso wie bei KELLER mehr Mitosen bei den reiferen Granuloblasten *in vitro* (21). Unter Azathioprinzusatz dagegen fallen besonders hohe Mitoseaktivitäten nach 24 Stunden auf, die jedoch nach weiteren 2 Kulturtagen erheblich abgenommen haben, was im Sinne einer Reifungsförderung gedeutet werden kann.

In den karyologischen Kurven lassen sich unter Azathioprineinwirkung keine Verschiebungen und Arretierungen einzelner Mitosephasen gegenüber den Kontrollkurven feststellen. Es wird also bestätigt, daß es sich bei Azathioprin um kein Mitosegift im engeren Sinne handelt. Die Änderungen der Mitose-Indiceswerte durch den Pharmakonzusatz betreffen alle mitoseaktiven Zellen und werden nicht in einer speziellen Zellklasse vermehrt beobachtet.

Betrachten wir die Wirkung des Azathioprin auf die Erythropoese, so fällt in allen Präparaten der 4 untersuchten Knochenmarkproben eine dosisunabhängige Verminderung der Regeneration ohne eindeutige Beeinflussung der Reifung auf. Diese Beobachtungen treffen überwiegend für die besonders hohen Mitoseaktivitäten zu. Die noch im

Streubereich der Normwerte liegenden Mitose-Indices - wie im Fall VI der 24-Stundenwert und im Fall V der 48-Stundenwert - werden gegenüber den Kontrollen nur unbedeutend verändert.

Im Fall II kommt es neben der Regenerationsverringering zusätzlich zu einer signifikanten Reifungsstörung an allen 3 Kulturtagen. Diese Proliferationshemmung konnte in keinem der übrigen Fälle beobachtet werden. Bei der Patientin mit der Erythroleukämie (Fall V) zeigt sich ein eher gegenteiliger, dem in der Granulopoese jedoch entsprechenden Effekt: Die Reifung wird in der Zusatzkultur nach 24-stündiger Bebrütung signifikant gefördert, was der verminderten Mitoseaktivität zunächst widerspricht. Eine direkte Ausreifung der im Original stark vermehrten basophilen Erythroblasten könnte in diesem Fall eine echte Reifungsförderung vortäuschen. Nach SCHWARTZ besitzen die basophilen Erythroblasten die Eigenschaft, Kern und Cytoplasma ohne mitotische Teilung zu verkleinern (37). Doch könnte es sich auch bei Verringerung des G/E-Indexes um eine Reifungsförderung bis zu den Erythrocyten also um eine Entkernungsförderung handeln. Eine Aufklärung, welche der beiden Möglichkeiten tatsächlich vorliegt, gelingt letztlich erst durch Zellzählung in Flüssigkeitskulturen.

Warum es im Fall II zu einer Proliferationsänderung kommt, kann bei unserer angewandten Versuchsmethode nicht beantwortet werden. Wir möchten die Proliferationshemmung jedoch nicht verwerten, da eine Reifungsstörung in keiner weiteren Zusatzkultur beobachtet wurde.

Zusammenfassend läßt sich aussagen, daß das Azathioprin auf die Erythropoese nur eine mäßige cytostatische Wirkung ausübt.

Am gleichen Patientengut führte KLIMAS Untersuchungen mit 6-Mercaptopurin durch. Seine Ergebnisse entsprechen teilweise den unsrigen, da die Reifungskurven unter 6-MP-Zusatz fast genau wie mit Azathioprin geändert sind, sowohl in den Fällen mit etwa normalem Knochenmark wie im leukämisch veränderten. KLIMAS beob-

achtete jedoch eine schwächere Mitoseindexverminderung bei identischen karyologischen Kurven (28). Dies spricht für eine Unabhängigkeit der Parameter der Regeneration und Reifung. Bei gleicher Dosierung beeinflusst also Azathioprin *in vitro* die Proliferation stärker, denn in den Zusatzkulturen wird die Regeneration deutlich gesenkt. Entsprechend benötigte BACH eine höhere Dosis 6-MP, um denselben Effekt auf die Verhinderung der Rosettenbildung auszuüben (2).

Als weitere Wirkung der Cytostatica wird eine Proliferationshemmung des für die Antikörperbildung kompetenten plasmazellulären Systems beschrieben. GERHARTZ und WEISE beobachteten nach längerer Applikation von 250 mg Azathioprin pro die in anschließenden Knochenmarkuntersuchungen eine Minderung der lymphoiden Retikulumzellen und Plasmazellen um 50% (23).

Wir können in unseren Versuchsreihen diese Ergebnisse nicht bestätigen. Unter der Konzentration von 0,1 mg% Azathioprin werden lediglich die lymphoiden Retikulumzellen um 30% vermindert, nicht jedoch die Plasmazellen. Wir müssen allerdings dabei berücksichtigen, daß unsere Differentialzählungen stets in retikulumzell-armen Gebieten erfolgten.

V. Zusammenfassung

An Knochenmark- und Blutkoagulumkulturen von 3 nicht leukämischen und 3 leukämischen Patienten untersuchen wir die Wirkung des Azathioprin. Eine Beeinflussung der Zellproliferation durch das Cytostaticum veranschaulichen in unserer Versuchsanordnung Reifungskurven und Mitose-Indices bis zu 3 Kulturtagen.

Der Zusatz von 0,5 mg% Azathioprin führt in unseren Kulturen zu einer irreversiblen Zellschädigung des hämatopoetischen Systems.

In den Konzentrationen von 0,05 und 0,1 mg% scheint das Azathioprin von reversibler wachstumshemmender Wirkung auf die Granulopoese zu sein, da sich in den 3 untersuchten Fällen mit etwa normalem Knochenmark eine Proliferationshemmung bis 24 Stunden erzeugen läßt. Auf die Erythropoese zeigt sich ein nur mäßiger Effekt.

Liegen ursprünglich besonders hohe Mitoseaktivitäten vor, so läßt sich eine Regenerationshemmung beobachten. Bei den 3 Kulturansätzen von myeloischen Leukämien finden wir nur in der Knochenmarkkultur einen Effekt durch das Azathioprin: eine kurzfristige Reifungsbeschleunigung, die einer Proliferationshemmung weicht. In den Blutkulturen wird die Wirkung des Azathioprin nicht deutlich.

Im Vergleich mit dem chemisch verwandten 6-MP zeigt sich unter Azathioprin eine stärkere Beeinflussung der Proliferation, insbesondere der Regeneration der Hämatopoese.

Unter der Konzentration von 0,1 mg% Azathioprin läßt sich eine 30%ige Minderung der lymphoiden Retikulumzellen erzielen, was im Hinblick auf die Immunosuppression von Interesse sein dürfte.

VI. Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurve
der Erythropoese.

Fall I

0,05 mg% Azathioprin nach 24 Std.:

Zelltyp	a	b	m ^(0,47)	Δ	Δ^2/m
PE	53	55	51	2	0,08
bE	234	259	231	3	0,04
pE	345	420	360	15	0,63
oE	97	122	103	6	0,35
rE	168	174	161	7	0,30
					$\chi^2 = 1,40$

0,05 mg% Azathioprin nach 48 Std.:

			m ^(0,45)		
PE	42	27	31	11	3,9
bE	96	106	91	5	0,3
pE	201	205	183	18	1,8
oE	69	108	80	11	1,5
rE	226	328	250	24	2,1
					$\chi^2 = 9,6$

0,05 mg% Azathioprin nach 72 Std.:

PE	5	8	6	1	0,2
bE	45	31	38	7	0,6
pE	118	114	116	2	0,0
oE	24	63	44	20	9,1
rE	210	140	170	40	9,4
					$\chi^2 = 19,3$

Tabelle 2: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Granulopoese.

Fall I

0,05 mg% Azathioprin nach 24 Std.:

Zelltyp	a	b	$m^{(0,51)}\Delta$	Δ^2/m
MB	18	4	11	7
PM	493	586	549	56
MC	337	330	340	3
eMC	97	89	95	2
PMo	27	15	21	6
MM	106	103	107	1
StG	79	90	86	7
SG	448	398	380	68
eSG	18	19	19	1
Mo	3	7	5	2
$\chi^2 =$				25,19

0,05 mg% Azathioprin nach 48 Std.:

MB	0	0	0	0	0,0
PM	287	490	389	102	26,9
MC	432	410	421	11	0,3
eMC	79	95	87	8	0,7
PMo	23	14	19	4	0,8
MM	227	168	197	30	4,5
StG	104	107	105	1	0,0
SG	655	440	547	108	21,3
eSG	24	29	26	2	0,2
Mo	17	10	13	4	1,2
$\chi^2 =$				55,9	

0,05 mg% Azathioprin nach 72 Std.:

MB	0	0	0	(0,46)	0,0
PM	83	149	107	24	5,3
MC	313	291	278	35	4,4
eMC	41	69	51	10	2,0
PMo	32	17	23	9	3,5
MM	164	202	168	4	0,0
StG	106	103	96	10	1,0
SG	355	455	372	17	0,8
eSG	8	23	14	6	2,6
Mo	11	11	10	1	0,1
				$\chi^2 =$	19,7

Tabelle 3: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Erythropoese.

Fall II

0,05 mg% Azathioprin nach 24 Std.:

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
PE	37	8	22	15	10,0
bE	110	64	87	23	6,1
pE	93	126	109	16	2,3
oE	25	25	25	0	0,0
rE	86	185	136	50	18,4
$\chi^2 =$					36,8

0,05 mg% Azathioprin nach 48 Std.:

PE	6	9	7	1	0,1
bE	66	28	47	19	7,7
pE	97	95	96	1	0,0
oE	34	36	35	1	0,0
rE	169	254	212	43	8,7
$\chi^2 =$					16,5

0,05 mg% Azathioprin nach 72 Std.:

PE	1	2	$1^{(0,35)}_0$		0,0
bE	7	6	4	3	2,0
pE	54	41	33	21	13,3
oE	27	28	19	8	3,4
rE	57	196	89	32	11,5
$\chi^2 =$					30,2

Tabelle 4: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Granulopoese.

Fall II

0,05 mg% Azathioprin nach 24 Std.:

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
MB	6	6	6	0	0,0
PM	225	332	278	53	10,0
MC	206	207	207	1	0,0
eMC	30	17	24	6	1,5
PM _o	9	17	13	4	1,2
MM	93	103	98	5	0,3
StG	53	14	33	20	12,0
SG	767	618	692	75	8,1
eSG	48	53	50	2	0,1
Mo	10	4	7	3	1,3

$$\chi^2 = 34,5$$

0,05 mg% Azathioprin nach 48 Std.:

MB	3	2	2	1	0,5
PM	138	121	129	9	0,6
MC	391	459	425	34	2,7
eMC	31	24	33	2	0,1
PM _o	10	3	7	3	1,3
MM	124	129	126	2	0,0
StG	46	31	38	8	2,0
SG	525	428	476	49	5,0
eSG	47	31	39	8	2,0
Mo	21	12	16	5	1,6

$$\chi^2 = 15,8$$

0,05 mg% Azathioprin nach 72 Std.:

MB	1	0	1 ^(0,56)	0	0,0
PM	44	35	44	0	0,0
MC	241	186	239	2	0,0
eMC	22	11	18	4	0,9
PM _o	4	2	3	1	0,3
MM	39	75	64	25	9,8
StG	15	15	16	1	0,0
SG	261	208	262	1	0,0
eSG	64	10	41	23	13,0
Mo	4	3	4	0	0,0

$$\chi^2 = 24,0$$

Tabelle 5: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Granulopoese.

Fall III

0,05 mg% Azathioprin nach 24 Std.:

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
MB	10	39	24	14	8,2
PM	123	153	138	15	1,6
MC	165	150	158	7	0,3
eMC	19	19	19	0	0,0
PMo	2	-	1	1	1,0
MM	64	67	65	1	0,0
StG	41	25	33	8	1,9
SG	499	502	501	2	0,0
eSG	14	7	10	4	1,6
Mo	8	1	5	3	1,8

$$\chi^2 = 16,4$$

0,05 mg% Azathioprin nach 48 Std.:

MB	8	6	7	1	0,1
PM	96	84	90	6	0,4
MC	110	147	128	18	2,5
eMC	12	10	11	1	0,1
PMo	-	-	-	-	-
MM	72	55	68	4	0,2
StG	36	29	33	3	0,3
SG	566	606	586	20	0,6
eSG	14	13	14	0	0,0
Mo	6	5	5	1	0,2

$$\chi^2 = 4,4$$

Tabelle 6: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Erythropoese.

Fall IV

0,05 mg% Azathioprin nach 24 Std.:

Zelltyp	a	b	$m^{(0,24)}\Delta$	Δ^2/m	
PE	0	13	3,00	3	3,0
bE	7	18	6	1	0,2
pE	5	15	5	0	0,0
oE	0	3	1	1	1,0
rE	14	36	12	2	0,4
$\chi^2 =$					4,6

Tabelle 7: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Granulopoese.

Fall IV

0,05 mg% Azathioprin nach 24 Std.:

Zelltyp	a	b	$m^{(0,35)}\Delta$	Δ^2/m	
MB	145	224	121	24	4,7
MBmikro ⁺⁾	132	210	119	13	1,4
PM	55	134	70	15	3,2
MC	75	164	84	9	1,0
eMC	0	0	0	0	0,0
PMo	0	1	0	0	0,0
MM	2	13	5	3	2,0
StG	0	2	1	1	1,0
SG	12	38	17	5	1,5
eSG	0	0	0	0	0,0
Mo	0	3	1	1	1,0
$\chi^2 =$					15,8

⁺⁾ Mikromyeloblasten

Tabelle 8: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Erythropoese.

Fall V

0,1 mg% Azathioprin nach 24 Std.:

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
PE	20	21	20	0	0,0
bE	57	49	53	4	0,3
pE	77	103	90	13	1,9
oE	19	15	17	2	0,2
rE	127	43	85	42	21,0
					$\chi^2 = 23,4$

0,1 mg% Azathioprin nach 48 Std.:

PE	10	10	$9^{(0,44)}$	1	0,1
bE	37	52	39	2	0,1
pE	109	121	101	8	0,6
oE	15	18	14	1	0,0
rE	196	265	203	12	0,7
					$\chi^2 = 1,5$

0,1 mg% Azathioprin nach 72 Std.:

PE	1	1	1	1	1,0
bE	18	10	14	4	1,1
pE	26	23	25	1	0,0
oE	27	9	18	9	4,5
rE	125	148	136	11	0,9
					$\chi^2 = 7,5$

Tabelle 9: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Granulopoese.

Fall V

0,1 mg% Azathioprin nach 24 Std.:

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
MB	305	442	373	68	12,3
PM	247	226	236	11	0,5
MC	446	442	444	2	0,0
eMC	7	1	4	3	2,0
PMo	1	9	5	4	3,2
MM	137	112	124	13	1,4
StG	35	34	34	1	0,0
SG	145	104	124	21	3,5
eSG	2	1	1	1	1,0
Mo	4	11	7	3	0,1

$$\chi^2 = 24,0$$

0,1 mg% Azathioprin nach 48 Std.:

MB	68	66	67	1	0,0
PM	185	152	168	17	1,7
MC	488	354	421	67	10,6
eMC	2	7	5	3	1,8
PMo	15	7	11	4	1,5
MM	127	168	147	20	2,7
StG	45	50	48	3	0,2
SG	183	249	216	33	5,0
eSG	4	14	9	5	2,8
Mo	6	16	11	5	2,3

$$\chi^2 = 28,6$$

0,1 mg% Azathioprin nach 72 Std.:

MB	43	8	28 ^(0,54)	15	8,0
PM	86	44	70	16	3,7
MC	202	193	213	11	0,6
eMC	3	2	3	0	0,0
PMo	2	1	2	0	0,0
MM	73	59	71	2	0,0
StG	29	32	33	4	0,5
SG	126	135	141	15	1,6
eSG	12	5	9	3	1,0
Mo	2	6	4	2	1,0

$$\chi^2 = 16,4$$

Tabelle 10: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Erythropoese.

Fall VI

0,1 mg% Azathioprin nach 24 Std.:

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
PE	8	6	7	1	0,1
bE	35	58	46	11	2,6
pE	72	96	84	12	1,7
oE	27	39	33	6	1,0
rE	279	273	276	3	0,0

$$\chi^2 = 5,4$$

0,1 mg% Azathioprin nach 48 Std.:

(0,34)

PE	10	8	6	4	2,8
bE	4	12	5	1	0,2
pE	18	27	15	3	0,6
oE	18	16	12	6	3,0
rE	175	379	190	15	1,2

$$\chi^2 = 7,8$$

0,1 mg% Azathioprin nach 72 Std.:

PE	3	0	2	1	0,5
bE	7	3	5	2	0,8
pE	1	11	6	5	4,2
oE	0	6	3	3	3,0
rE	91	111	101	10	1,0

$$\chi^2 = 9,5$$

Tabelle 11: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Granulopoese.

Fall VI

0,1 mg% Azathioprin nach 24 Std.					
Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
MB	10	6	8	2	0,5
PM	269	193	231	38	6,1
MC	339	291	315	24	1,83
eMC	203	102	152	51	17,0
PMo	5	10	8	3	1,0
MM	141	79	110	31	9,0
StG	88	55	71	17	4,2
SG	198	369	284	86	27,0
eSG	125	189	157	32	7,0
Mo	7	15	11	4	1,5
$\chi^2 =$					75,1

0,1 mg% Azathioprin nach 48 Std.					
MB	5	1	3 ^(0,54)	2	1,3
PM	269	164	234	35	5,2
MC	354	304	355	1	0,0
eMC	245	145	210	35	5,8
PMo	10	17	15	5	1,7
MM	88	53	77	11	1,6
StG	91	41	71	20	5,6
SG	232	295	285	53	9,8
eSG	188	246	234	46	9,2
Mo	9	5	8	1	0,1
$\chi^2 =$					40,3

0,1 mg% Azathioprin nach 72 Std.:					
MB	2	0	1	1	1,0
PM	64	20	42	22	11,5
MC	126	190	158	32	8,6
eMC	102	59	80	22	6,0
PMo	0	2	1	1	1,0
MM	45	47	46	1	0,0
StG	28	24	26	2	0,2
SG	212	208	210	2	0,0
eSG	106	98	102	4	0,1
Mo	7	6	6	1	0,2
$\chi^2 =$					28,6

Tabelle 12: Mitose-Indices der Erythropoese (in Promille)

	Original	Kontrolle			Azathioprin 0,05 mg%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall I:	22,0	37,0	53,0	69,0	30,0	47,0	42,0
Fall II:	72,2	49,3	65,4	39,3	22,0	35,0	45,0
Arith. Mittel	47,1	44,5	59,2	54,1	26,0	41,0	43,5

	Original	Kontrolle			Azathioprin 0,1 mg%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall V:	71,0	53,0	30,0	70,0	29,0	35,0	14,0
Fall VI:	17,0	5,0	32,0	-	7,0	-	-
Arith. Mittel	44,0	29,0	31,6	70,0	18,0	35,0	14,0

Tabelle 13: Mitose-Indices der Granulopoese (in Promille)

	Original	Kontrolle			Azathioprin 0,05 mg%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall I:	2,0	15,0	10,9	22,5	9,3	13,0	23,0
Fall II:	21,0	32,8	24,6	17,0	18,9	12,0	16,0
Fall III:	8,2	5,5	-	-	9,2	-	-
Fall IV:	6,9	8,1	-	-	4,9	-	-
Arith. Mittel	9,5	15,4	17,7	19,7	10,6	12,5	19,6

	Original	Kontrolle			Azathioprin 0,1 mg%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall V:	29,0	8,9	22,0	20,0	9,9	6,6	6,0
Fall VI:	7,0	12,0	3,2	7,4	6,0	4,0	7,0
Arith. Mittel	18,0	10,45	12,6	13,7	7,95	5,3	6,5

Tabelle 14: G/E - Indices

	Original	Kontr. /Azathio- prin		Kontr. /Azathio- prin		Kontr. /Azathio- prin	
	0 h	24 h		48 h		72 h	
	0	0	0,05 mg%	0	0,05 mg%	0	0,05 mg%
Fall I:	2,0	1,55	1,81	2,27	2,91	3,9	2,79
Fall II:	4,2	3,3	4,1	2,9	3,6	2,0	4,75
	0	0	0,1 mg%	0	0,1 mg%	0	0,1 mg%
Fall V:	2,4	6,0	4,4	2,5	3,1	2,5	2,9
Fall VI:	3,6	2,8	3,3	2,9	6,7	5,0	6,8

FALL I

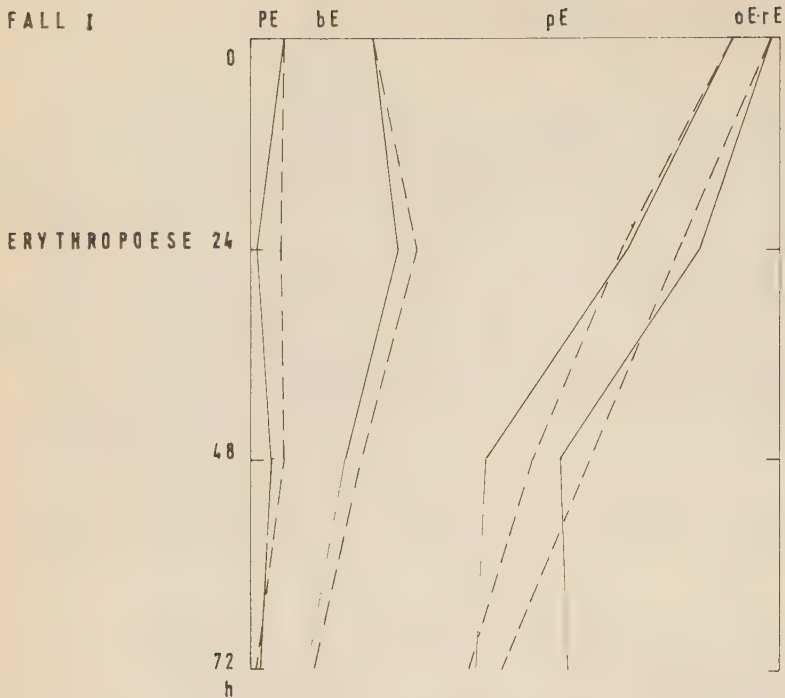
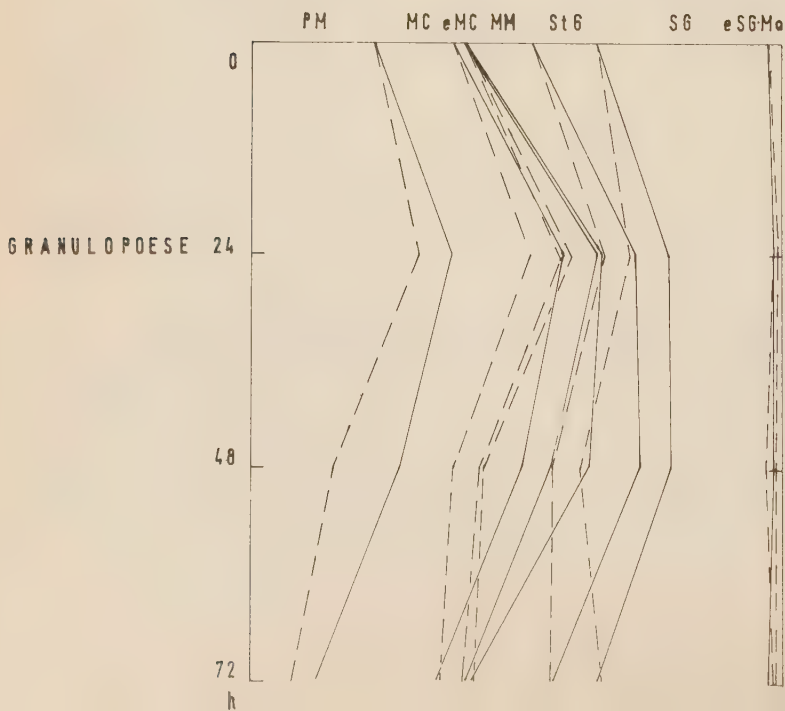


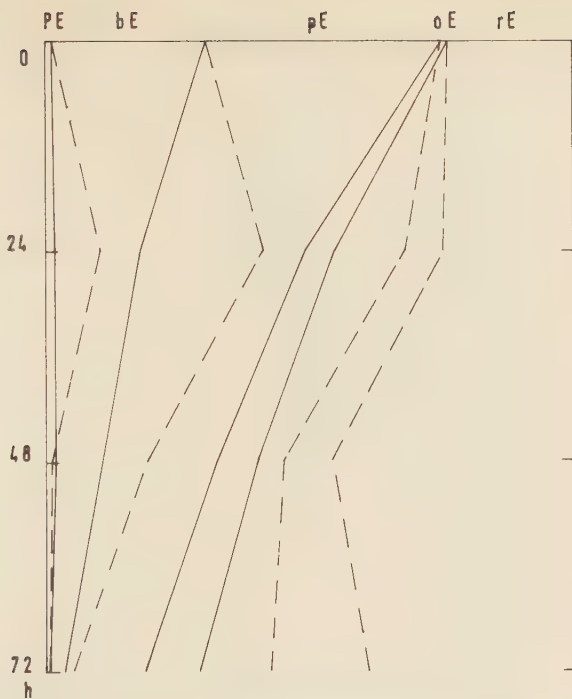
Abb. 1



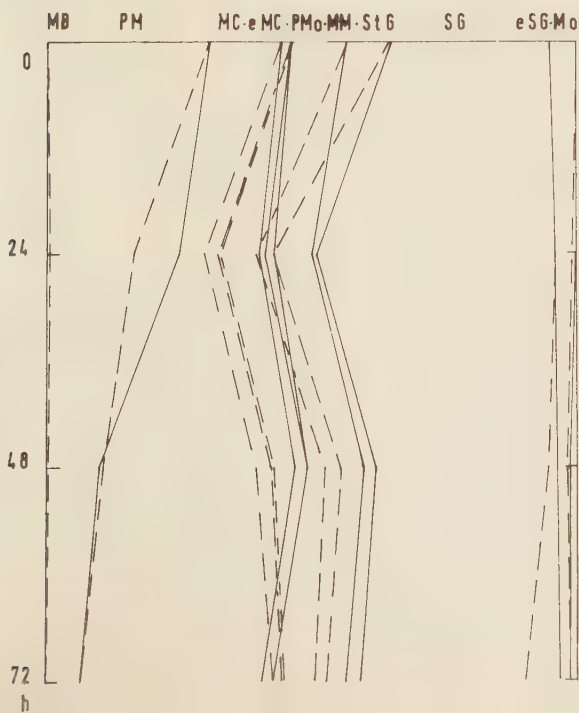
FALL II

Abb. 2

ERYTHROPOESE



GRANULOPOESE



FALL III

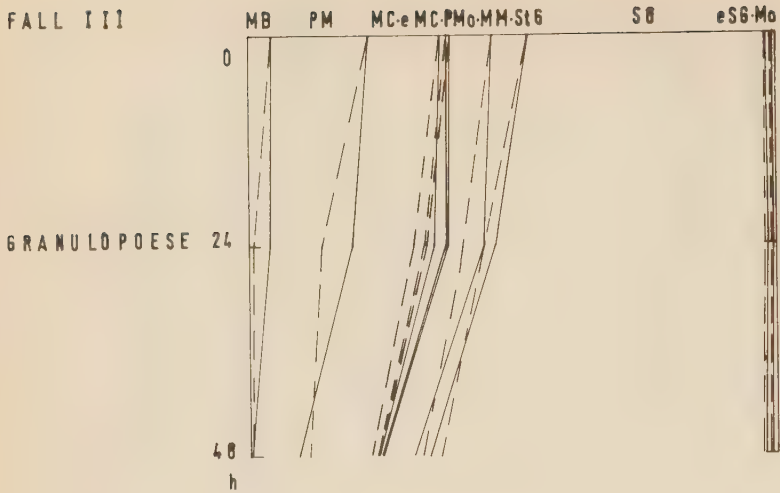


Abb. 3

FALL IV

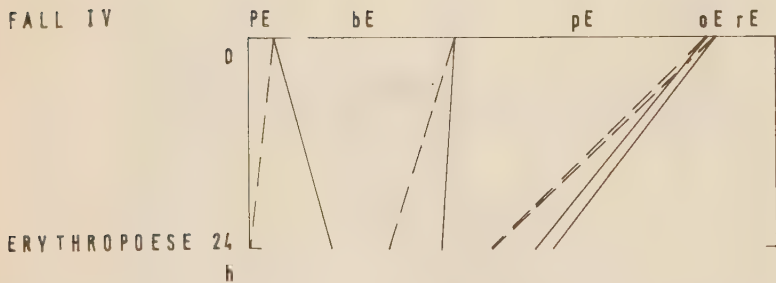
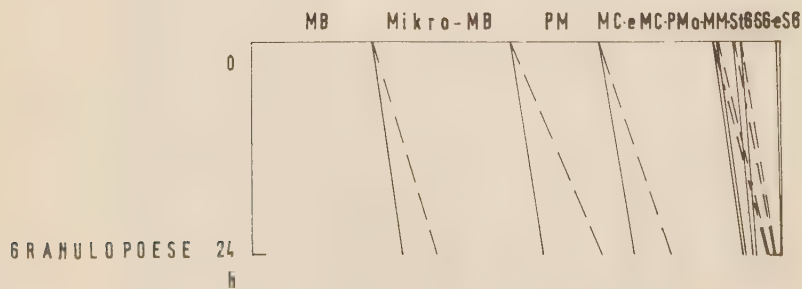


Abb. 4



FALL V

PE

bE

pE

oE rE

Abb. 5

ERYTHROPOESE

0

24

48

72

h

GRANULOPOESE

0

24

48

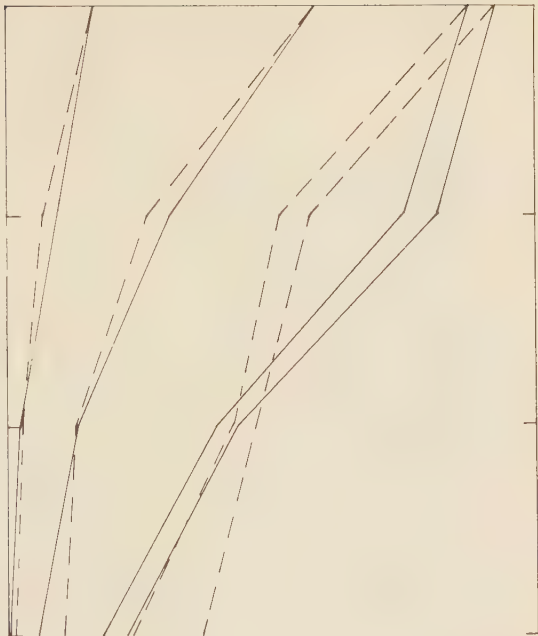
72

h

MB

PM

MC-e MC-PMo MM-St6 SG-e SMo



FALL VI

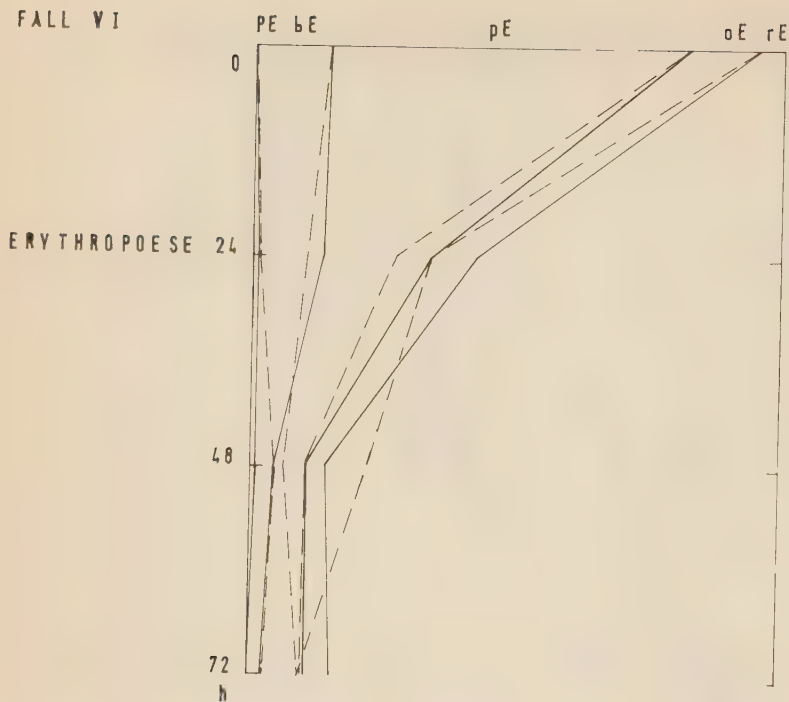


Abb. 6

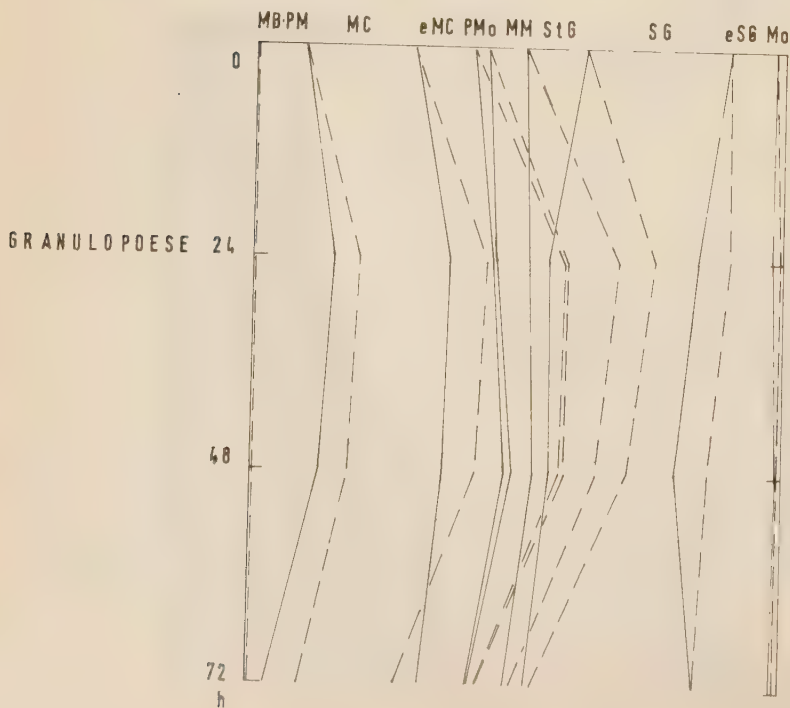


Abb. 7

VERTEILUNG DER MITOSEPHASEN.

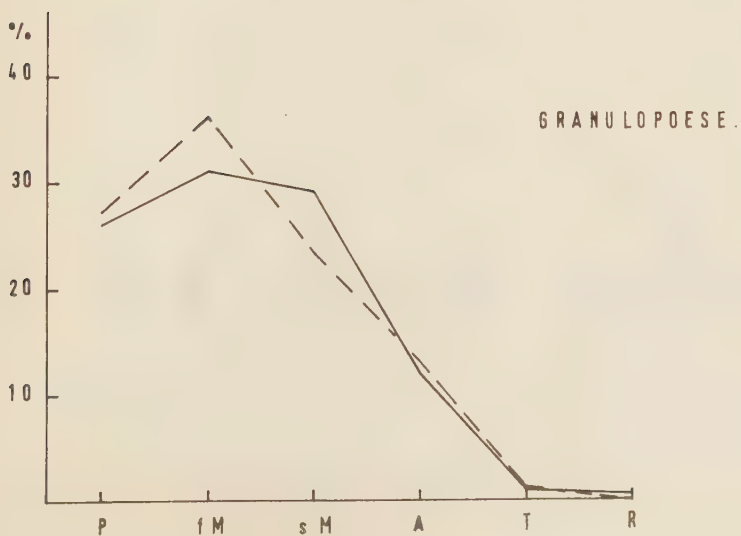
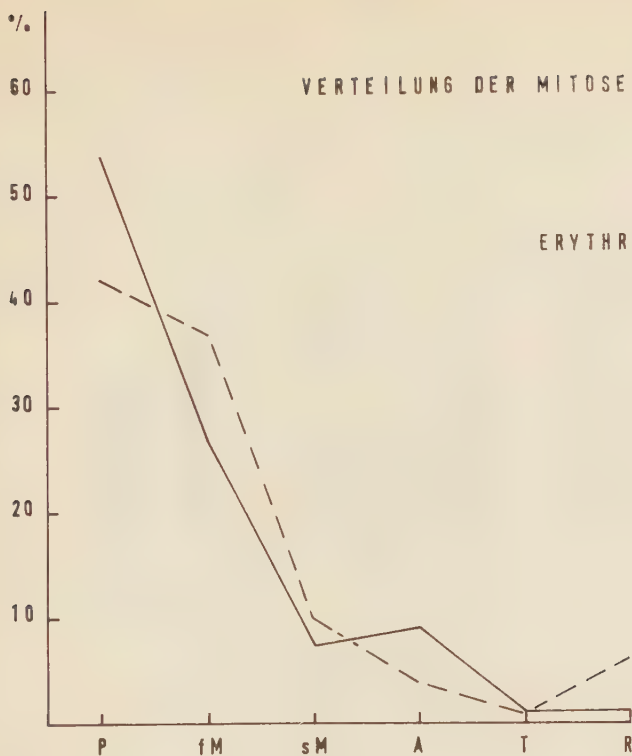


Abb. 8

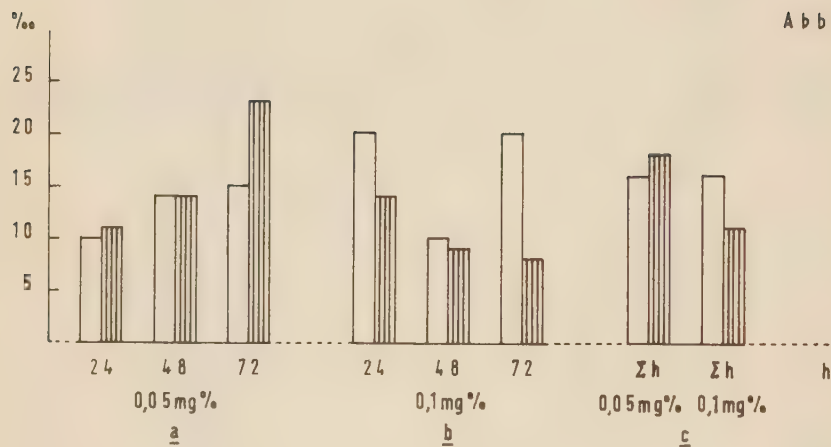
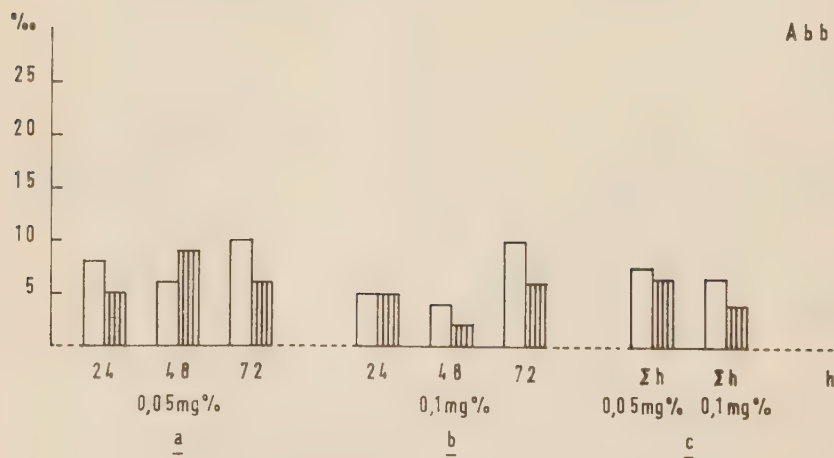


Abb. 9



VII. Literatur

1. AMIEL, J. -L.: Immuno-dépresseurs chimique et transplantations d'organes.
Presse méd. 75, 1801 (1967).
2. BACH, J.F., M. DARDENNE and C. FOURNIER: In vitro Evaluation of Immunosuppressive Drugs.
Nature, 222, 998 (1969).
3. BARNIKOL, H. U. u. K. O. VORLAENDER: Voraussetzungen und erste Ergebnisse zur therapeutischen Anwendung des Azathioprin (Imuran) beim chronisch-progredienten Gelenk-rheumatismus und bei sogenannten Kollagenkrankheiten.
Med. Welt 18, 160 (1967).
4. BARTELSHEIMER, H., u. H. FRENZEL: Erwünschte und unerwünschte Wirkungen der zytostatischen Therapie.
Med. Klinik 43, 1653 (1967).
5. BOLL, I. u. G. FUCHS: Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro.
Blut VII, 257 (1961).
6. BOLL, I.: Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.
Springer Verlag, Heidelberg 1966.
7. BOLL, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. I. Granuloblastenmitosen.
Folia haemat. 3, 58 (1958).
8. BOLL, I.: Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen Granulocytopoese.
Fol. haemat. (Leipzig) 91, 172 (1969).
9. BOLL, I.: Hämocytyblasten in der Knochenmark-Kurzkultur.
Ein Beitrag zur Pathogenese akuter Leukämien.
Proc. 10th Congr. europ. Soc. Haemat., (Strasbourg 1965), part II, 591 (1967).

10. BRESNIK, E.: The metabolism in vitro of antitumor Imidazolyl-derivates of Mercaptopurines.
Fed.Proc. 18, 371 (1959).
11. CHALMERS, A.H., P.R. KNIGHT and M.R. ATKINSON:
Conversion of Azathioprine into Mercaptopurine and
Mercaptoimidazole Derivates in vitro and during immuno-
suppressive therapy.
Aust.J. exp.Biol.med.Sci. 45, 681 (1967).
12. CORLEY, Ch.C., H.E. LESSNER and W.E. LARSEN:
Azathioprine therapy of autoimmune diseases.
Amer.J.Med. 41, 404 (1966).
13. DUSTIN, P.: Die cytostatischen Substanzen und ihre Wirkung
auf die Hämatopoese.
Handbuch der ges. Hämatologie, III. Urban & Schwarzenberg,
München, Berlin, Wien (1960).
14. EBERLE, P., W. HUNSTEIN and E. PERINGS: Chromosomes in
Patients treated with Imuran.
Humangenetik 6, 69 (1968).
15. ELION, G.B., S. CALLAHAN, S. BIEBER, G.H. HITCHINGS and
R.W. RUNDLES: A Summery of Investigations with
6-((1-methyl-4-nitro-5-imidazolyl)thio)Purine.
Cancer Chemother.Rep. 14, 93 (1961).
16. ELION, G.B. and G.H. HITCHINGS: The Metabolism in vivo of
antitumor Imidazolyl derivates of Mercaptopurines.
Fed.proc. 18, 221 (1959).
17. ERIDIANI, S., D. TAGLIORETTI and R. TISO: Clinical Trial
of Azathioprine, a new antileukaemic compound.
Panminerva medica 7, 275 (1965).
18. FLIEDNER, T.M. and E.P. CRONKITE: X.internat.haem.congr.
Stockholm (1964).

19. GANSSEN, O.: Mitosephasenablauf im Sternalmark akuter Leukaemien; eine vergleichende Untersuchung zur normalen Granulopoese.
Med.Diss. FU Berlin 1962.
20. Geigy documenta. Wissenschaftliche Tabellen.
J.R. Geigy, Basel 1960.
21. KELLER, K.: Reifungsphänomene der Granulopoese akuter Leukämien in vitro.
Med. Diss. FU Berlin 1967.
22. GERHARTZ, H., H. KESSEL u. W. WEISE: Die klinische Bedeutung der Cytostatica zur Unterdrückung von Autoimmunreaktionen.
Dtsch.Ges.inn.Med. 72, 320 (1966).
23. GERHARTZ, H. u. W. WEISE: Die Chemotherapie der Autoaggressionskrankheiten.
Intern. Zeitschr. für klin. Pharmak. Therapie u. Toxikologie 1 (1967).
24. GERHARTZ, H.: Habilitationsschrift (1958).
25. HITCHINGS, G.H. and G.B. ELION: Chemical suppression of the immune response.
Pharmacol. Rev. 15, 365 (1963).
26. HITZIG, W.H.: Immunosuppressive Therapie.
Praxis 55, 61 (1966).
27. HUNSTEIN, W., E. PERINGS u. E. KLOSE: Tierexperimentelle Langzeitversuche mit Azathioprin (Imuran) zur Prüfung seiner myelotoxischen Wirkung.
Verhandlg. d. dtsch. Gesellsch. f. inn. Med., 37. Kongr. München (1967) Verlag J. F. Bergmann.
28. KLIMAS, J.: Die Einwirkung von 6-Mercaptopurin auf menschliches Knochenmark in vitro.
Med.Diss. FU Berlin (im Druck).

29. KNICK, B., F. ROTHER u. H. NIEMCZYK: Akute und chronische Lebererkrankungen.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1966.
30. KOCHERGIN, P.M. et al.: The synthesis of Azathioprine.
Med.Promyshl SSSR 8, 6 (1965).
31. KROGH JENSEN, M. and M. SØBORG: Chromosome Aberrations in human cells following treatment with Imuran.
Acta med.scand. 179, 249 (1966).
32. MATHE, G.: Reduction by Azathioprine of inhibition of allogenic bone marrow grafts by prior blood transfusions.
Rev.Franc.Etud.Clin.Biol. 11, 1026 (1966).
33. OECHSLEN, D., R. KLUTHE u. H. SARRE: Zur Cytostatica-therapie des corticoidresistenten nephrotischen Syndroms.
Archiv f.klin.Medizin 215, 150 (1968).
34. POSER, G., R. KLUTHE u. P. ADLER: Zur Therapie des nephrotischen Syndroms.
Med.Klinik 11, 432 (1966).
35. RHOMBERG, F. u. W. SIEGENTHALER: Erfahrungen mit der immunsuppressiven Therapie in der inneren Medizin.
Schweiz.med.Wochenschr. 97, 255 (1967).
36. RUNDLES, R.W., J. LASZLO et al.: Clinical and hematologic Study of 6-(1-Methyl-4-nitro-5-imidazolyl) thio)-Purine (B.W.57-322) and related compounds.
Cancer chem.Rep. 14, 99 (1961).
37. SCHWARZ, E.: Maturation and proliferation in normo- and megaloblastic erythropoiesis.
Acta med.scand. CXXXIX, 445 (1951).
38. STEINER, B.: Das Goodpasture-Syndrom.
British med.Journal I, 292 (1966).

39. STOEBER, E., G. KÖLLE u. H.P. GRANER: Immunosuppressive Therapie bei Kindern.
Münch.med.Wschr. 109, 1892 (1967).
40. STORTI, E., A. TRALDI, D. QUAGLINO: Clinical Studies on the effect of Imuran and Vincristine in the treatment of leukaemia.
Acta Gen.Med.et Ge. XVII, 220 (1968).
41. STORTI, E.: zit. n. HONETZ, N.: Über Erfahrungen mit der hochdosierten Azathioprinbehandlung bei akuten Leukosen. Intern. Arb.Tag. über Chemo-u. Immunother. d. Leukosen und malignen Lymphome. Wien, März 1969, S. 11.
42. TAGLIORETTI, D. and A. GIANGRANDE: Azathioprine in Myeloproliferative and autoimmune disorders.
Acta Gen.Med. et Ge.XVII, 258 (1968).
43. WHITE, R.H.R., J.S. CAMERON and J.R. TRAUNCE: Immunosuppressive therapy in Steroid-resistant proliferative Glomerulonephritis accompanied by the Nephrotic Syndrome.
British med.J. II, 853 (1966).

Frau Professor Dr.med. Irene BOLL möchte ich für
die Überlassung des Themas und für ihr stetiges Interesse
am Fortgang dieser Arbeit sehr danken.

Lebenslauf

Geboren am 28. März 1946 in Berlin-Konradshöhe.
Besuch der 18. Grundschule in Berlin-Tegelort und des
Humboldt-Gymnasiums in Berlin-Tegel.

Reifeprüfung im März 1965.

Beginn des Studiums der Zahnheilkunde im Sommer 1965
an der Freien Universität Berlin. Dort zahnärztliche Vor-
prüfung im Herbst 1967 und zahnärztliche Prüfung im
Sommer 1970.

